

*UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
LYMPHOTOXIN-SYNTHESE UND IHRE
BEEINFLUSSUNG DURCH HEMMSTOFFE DER
DNS-, RNS- UND PROTEIN-SYNTHESE*

Eveline DYMARCZYK

1983

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 2014774



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Kinderklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. K. Betke

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE LYMPHOTOXIN-SYNTHESE
UND IHRE BEEINFLUSSUNG DURCH HEMMSTOFFE DER
DNS-, RNS- UND PROTEIN-SYNTHESE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Eveline Dymarczyk
aus
Wien

1982

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. R. Eife

Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. Betke

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.2.1983



Meinen Eltern

Herrn Priv. Doz. Dr. R. Eife danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für die Anregungen und Diskussionen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Den Mitarbeitern des Immunologischen Labors, besonders Frau M. Tavera, danke ich für die Einarbeitung in die Methodik und die Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Das Lymphotoxin-System	1
1.2.1	Bildung von Lymphotoxin in vitro	2
1.2.2	Klassifizierung von Lymphotoxin	2
1.2.3	Wirkung von Lymphotoxin	5
1.3	Problemstellung	6
2	Materialien	8
2.1	Präparate und Zellen	8
2.2	Apparative Hilfsmittel	9
2.3	Zubereitung bestimmter Präparate	9
2.4	Zusammensetzung der Medien	10
2.5	Herstellung der Stoffwechsellinhibitor-Lösungen	10
3	Methodik	11
3.1	Gewinnung und Kultivierung von Lymphozyten	11
3.2	Lymphozyten-Stimulation	12
3.3	Dosiswirkungsstudien	12
3.4	Kinetikstudien	13
3.5	Bestimmung der Lymphoproliferation	14
3.6	Dialyse der zellfreien Lymphozyten-Kulturmedien	14
3.7	Lymphotoxin-Nachweis im DNS-Synthese-Hemmtest	15
3.8	Berechnung der Lymphotoxin-Aktivität	15
3.9	Untersuchungen zur Interferenz von Lymphotoxin und Stoffwechsellinhibitoren im DNS-Synthese- Hemmtest	16
4	Experimentelle Untersuchungen	17
4.1	Mitomycin C	17
4.1.1	Der Wirkungsmechanismus von Mitomycin C (Literatur)	17
4.1.2	Die Wirkung von Mitomycin C auf die Lymphotoxin-Bildung und Lymphoprolife- ration (Dosiswirkungsstudie)	18
4.1.3	Die Interferenz von Lymphotoxin und Mitomycin C im DNS-Synthese-Hemmtest	25
4.2	Hydroxyurea	28
4.2.1	Der Wirkungsmechanismus von Hydroxyurea (Literatur)	28
4.2.2	Die Wirkung von Hydroxyurea auf die Lymphotoxin-Bildung und Lymphoprolife- ration (Dosiswirkungsstudie)	29
4.2.3	Die Wirkung von Hydroxyurea auf die Kinetik der Lymphotoxin-Bildung (Kinetikstudie)	34
4.2.4	Die Interferenz von Lymphotoxin und Hydroxyurea im DNS-Synthese-Hemmtest	39
4.3	Actinomycin D	41
4.3.1	Die Wirkung von Actinomycin D auf Lymphozyten	41

4.3.2	Lymphotoxin-Bildung und Lymphoprolifera- tion nach Vorinkubation mit Actinomycin D	42
4.3.3	Lymphotoxin-Bildung und Lymphoprolifera- nach gleichzeitiger Zugabe von Actino- mycin D und Mitogen	45
4.3.4	Lymphotoxin-Bildung und Lymphoprolifera- tion nach Zugabe von Actinomycin D während der frühen Phase der PHA-Stimulation	47
4.3.5	Lymphotoxin-Kinetik und Hemmung der Lympho- toxin-Bildung und Lymphoproliferation durch Actinomycin D (Kinetikstudie)	50
4.4	Cycloheximid	54
4.4.1	Die Wirkung von Cycloheximid auf die Lympho- toxin-Bildung und Lymphoproliferation	54
4.4.2	Lymphotoxin-Kinetik und Hemmung der Lympho- toxin-Bildung und Lymphoproliferation durch Cycloheximid (Kinetikstudie)	54
4.5	Emetin	60
4.5.1	Der Wirkungsmechanismus von Emetin (Literatur)	60
4.5.2	Die Wirkung von Emetin auf die Lymphotoxin- Bildung und Lymphoproliferation (Dosiswirkungsstudie)	61
4.5.3	Lymphotoxin-Kinetik und Hemmung der Lympho- toxin-Bildung und Lymphoproliferation durch Emetin (Kinetikstudie)	65
4.5.4	Die Interferenz von Lymphotoxin und Emetin im DNS-Synthese-Hemmtest	73
4.6	Chloramphenicol	76
4.6.1	Der Wirkungsmechanismus von Chloramphenicol (Literatur)	76
4.6.2	Die Wirkung von Chloramphenicol auf die Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation (Dosiswirkungsstudie)	77
4.6.3	Die Interferenz von Lymphotoxin und Chlor- amphenicol im DNS-Synthese-Hemmtest	80
5	Diskussion	82
5.1	Lymphotoxin-Bildung bei Blockierung der DNS-Synthese	84
5.2	Lymphotoxin-Bildung bei Blockierung der RNS-Synthese	88
5.3	Lymphotoxin-Bildung bei Blockierung der Protein- Synthese	90
5.4	Lymphotoxin-Freisetzung nach Blockierung des Sekre- tionsmechanismus	92
5.5	Interferenz von Lymphotoxin und Stoffwechselinhibi- toren im DNS-Synthese-Hemmtest	93
6	Zusammenfassung	97
7	Literaturverzeichnis	99

1 Einleitung

1.1 Einführung

Immunreaktionen werden durch humorale und zelluläre Faktoren vermittelt. Durch spezifische Wechselwirkung der Lymphozytenoberfläche mit dem Antigen können einmal - durch Proliferation - eine Expansion spezifisch-sensibilisierter Zellen (Zellklone) und zum anderen (im B-Zellsystem) die Antikörper-Bildung und (im T-Zellsystem) zytotoxische ("Killer"-Zellen) und immunregulatorische ("Helfer"- bzw. "Suppressor"-Zellen) Reaktionen ausgelöst werden (26). Die T-Zell-Reaktionen werden dabei wahrscheinlich sowohl direkt (Zell-Zell-Kontakt) wie auch über lösliche "Mediatoren" vermittelt (26).

Als ein in vitro-Modell für zellvermittelte Immunreaktionen wird die durch spezifische und unspezifische Stimulatoren ausgelöste und mit DNS-, RNS- und Proteinsynthesesteigerung einhergehende "Lymphoproliferation" angesehen (142). Während dieser in vitro-Prozesse läßt sich die Bildung einer Gruppe von biologisch aktiven Substanzen, den sogenannten "Lymphokinen" nachweisen, die durch ihre Wirkung auf eine Reihe anderer Zellen wie z.B. Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten oder HeLa-Zellen zu unterscheiden sind (91). Eines der Lymphokine mit zytotoxischen Eigenschaften ist das "Lymphotoxin" (36).

1.2 Das Lymphotoxin-System

Im Zusammenhang mit der komplementunabhängigen, Lymphozytenvermittelten Zytolyse wurde 1968 bei Mäuse- und Rattenlymphozyten zum ersten Mal von einer löslichen, nicht mit Antikörpern verwandten, zytotoxischen Substanz, dem "Lymphotoxin" berichtet (34, 36, 105).

1.2.1 Bildung von Lymphotoxin in vitro

Die Bildung von Lymphotoxin kann in vitro sowohl durch Inkubation sensibilisierter Lymphozyten mit Antigen in gelöster oder zellulärer Form, als auch durch Inkubation nicht-sensibilisierter Lymphozyten mit den sogenannten Mitogenen induziert werden (71, 102, 108).

Die in dieser Arbeit verwendeten Mitogene Phytohämagglutinin (PHA) und Concanavalin A (Con A) sind beide T-Zell-spezifisch, stimulieren jedoch verschiedene T-Zell-Untergruppen (21, 26). Con A stimuliert die meisten der T-Zell-Subpopulationen wie Suppressor, Helfer und Killer-Zellen (57). Konzentrationsabhängig sollen jedoch verschiedene Untergruppen bevorzugt aktiviert werden (93). Dagegen sind die PHA-sensiblen Zellen vorwiegend zu den Suppressor-Zellen zu rechnen (57). Beide Mitogene induzieren die Entwicklung zytotoxischer T-Zellen (57).

PHA und Con A bewirken über Rezeptoren der Zellmembran die Umwandlung des ruhenden Lymphozyten in den zur Zellteilung befähigten Lymphoblasten (26, 71, 87, 108). Bereits nach wenigen Stunden ist eine Steigerung der Protein- und RNS-Synthese nachweisbar. Nach 24-36 Stunden beginnt die DNS-Synthese und erreicht je nach Mitogen - bei PHA früher als bei Con A - ihr Maximum um den 3. Tag. Nach 48-72 Stunden sind die Vorbereitungen für die Zellteilung abgeschlossen (26, 71, 87, 108).

Die Sekretion von Lymphotoxin beginnt bereits 2-3 Stunden nach Stimulation meßbar zu werden und kann bei PHA-Stimulation bis zum 7. Tag, bei Con A-Stimulation bis zum 4. Tag ansteigen (12, 108, 139).

Im allgemeinen lassen sich durch PHA in Lymphozyten die höchsten Lymphotoxin-Synthese-Leistungen induzieren (4,12,108). PHA-stimulierte Zellen bilden auch nach Entfernen des Stimulus einige

Zeit weiterhin Lymphotoxin (87, 102, 139). Con A stimuliert die Lymphotoxin-Bildung nicht in diesem Maß; auch ist seine ständige Anwesenheit in der Kultur erforderlich (12).

Zur Stimulation maximaler Lymphotoxin-Bildung sind höhere Konzentrationen der Mitogene notwendig, als zur Induktion maximaler Lymphoproliferation. Wir verwendeten in dieser Arbeit deshalb Mitogendosen, die unter unseren Versuchsbedingungen als optimale "Kompromiss"-Konzentrationen für beide Lymphozyten-Funktionen angesehen werden können (15). Zu hohe Mitogenkonzentrationen haben auf die DNS-Synthese einen hemmenden Effekt (18, 57).

Bisher wurden hauptsächlich stimulierte T-Zellen für die Lymphotoxin-Bildung verantwortlich gemacht. In vitro-Untersuchungen von Lymphozyten immundefizienter Patienten, die eine Korrelation zwischen gestörter Lymphotoxin-Bildung und zellulärer Immundefizienz zeigten, bestätigten diese Hypothese (15). Man muß heute jedoch annehmen, daß unter bestimmten in vitro-Bedingungen auch B-Zellen zur Lymphotoxin-Synthese befähigt sind (3, 109). So kann in Lymphoidzell-Linien aus B-Zellen eine spontane Lymphotoxin-Bildung nachgewiesen werden (2, 35, 20).

1.2.2 Klassifizierung von Lymphotoxin

"Lymphotoxin" ist ein heterogenes System verschiedener Makromoleküle mit Proteincharakter, die nach ihrem Molekulargewicht in vier Klassen unterteilt werden (37, 53, 54, 64, 134).

1. Lymphotoxin-Komplexe 200.000 Dalton,
2. α -Lymphotoxin 70.000 bis 150.000 Dalton,
3. β -Lymphotoxin 30.000 bis 50.000 Dalton,
4. γ -Lymphotoxin 15.000 bis 20.000 Dalton (24).

Die vier Klassen unterscheiden sich

1. durch ihre Stabilität:

Mit steigendem Molekulargewicht nimmt die Stabilität der Lymphotoxin-Klassen und -Subklassen bei Erhitzen, Lagerung (Einfrieren) und Fraktionierung zu (37). Lymphotoxin-Komplexe und α -Lymphotoxin sind - auch nach Fraktionierung - über einen längeren Zeitraum unempfindlich gegenüber Einfrieren; dagegen sind β - und γ -Lymphotoxin im serumhaltigen Medium instabil (37, 53). Bei 56°C sind Lymphotoxin-Komplexe, α - und β_2 -Lymphotoxin über einige Stunden stabil, wogegen β_1 - und γ -Lymphotoxin schnell inaktiviert werden (37).

2. durch die Kinetik ihrer Bildung bzw. Sekretion:

Die Lymphotoxin-Klassen mit niedrigem Molekulargewicht sind im Kulturmedium zu einem früheren Zeitpunkt nachweisbar als diejenigen mit hohem Molekulargewicht (37). Die Bildung von γ -Lymphotoxin erreicht ihr Maximum innerhalb der ersten 24 Stunden, die von β -Lymphotoxin zwischen der 8.-24. Stunde und die von α -Lymphotoxin zwischen dem 2.-5. Tag (25, 53, 134). γ -Lymphotoxin und β -Lymphotoxin entsprechen nach der Nomenklatur von WALKER (133) dem "frühen", α -Lymphotoxin dem "späten" Lymphotoxin.

3. durch ihren Anteil an der zytotoxischen Gesamtaktivität:

Bei Erfassung von 75-95 % der Gesamtaktivität von Lymphotoxin im zellfreien Medium PHA-stimulierter Lymphozyten-Kulturen verteilt sich nach 60 Stunden Inkubation die zytotoxische Aktivität zu 5-20 % auf die Lymphotoxin-Komplexe, zu 40-60 % auf α -Lymphotoxin, zu 20-40 % auf β -Lymphotoxin und bis zu 10 % auf γ -Lymphotoxin (37).

α - und β -Lymphotoxin lassen sich durch Ionenaustauschchromatographie und Gelelektrophorese in zahlreiche Subklassen (α_1 , α_{2a-e} , α_3 , β_1 und β_2) und die Lymphotoxin-Komplexe nach ihrem Molekulargewicht in Cx_1 - bis Cx_4 -Komplexe trennen (37, 51, 144). Lymphotoxin-Klassen und -Subklassen haben teils gemeinsame, teils unterschiedliche antigene Determinanten (143).

Gesamtlymphotoxingehalt und Anteil der einzelnen Lymphotoxin-Klassen werden durch die Stabilität der einzelnen Lymphotoxine (z.B. β -Lymphotoxin), die Kulturbedingungen (z.B. A- bzw. Dissoziation der Lymphotoxin-Komplexe in Abhängigkeit vom Ionenmilieu) und den Typ der Lymphotoxin-bildenden Zellen (z.B. etablierte Lymphoidzell-Linien aus B-Zellen bilden nur α -Lymphotoxin) beeinflusst (2, 20, 35, 37, 54, 134).

Die Lymphotoxin-Komplexe sind Aggregate der übrigen Lymphotoxin-Klassen (37, 143). Die verschiedenen Lymphotoxin-Klassen assoziieren sich locker um ein Träger-Molekül zu hochmolekularen Komplexen (51, 52, 144). Die Stabilität dieser komplexierten Lymphotoxin-Formen hängt vom Ionenmilieu des umgebenden Medium ab (37, 51). Bei hoher Ionenkonzentration dissoziieren sie vorwiegend in α -ähnliche Lymphotoxin-Klassen (144). Die Lymphotoxin-Komplexe besitzen im Vergleich zu den nur schwach zytolytischen α -, β - und γ -Lymphotoxinen eine stärker und schneller wirkende Zytotoxizität (144). Außerdem können sich die Lymphotoxin-Komplexe mit Ig-ähnlichen, Antigen-bindenden Molekülen verbinden und somit ihre lytische Aktivität auf spezifische Antigene ausrichten (51, 52). Der Anteil der Ig-Lymphotoxin-Komplexe ist nach Stimulation mit Antigen größer als nach Mitogen-Stimulation (52).

Lymphotoxin kann - vor allem nach Mitogenstimulation - auch an die T-Zellmembran gebunden sein (50, 51). In dieser Form hat es keine zytotoxische Wirkung (50, 55). Durch erneute Stimulation kann es aber unabhängig von Proteinsynthese und Sekretionsmechanismen aktiviert und ins Medium abgegeben werden (50, 55, 56, 83).

1.2.3 Wirkung von Lymphotoxin

Lymphotoxin lysiert allo- und xenogene Zellen (102, 140). Die Zytolyse ist temperaturabhängig und nimmt mit dem Quadrat der Lymphotoxin-Konzentration und exponentiell zur Inkubationsdauer zu (38, 67, 135, 140). Nach Bindung an "spezifische" Membranrezeptoren (125) bewirkt Lymphotoxin in niedrigen Kon-

zentrationen die Abnahme bzw. Hemmung der Zellteilungsaktivität der Indikatorzellen. In hohen Konzentrationen führt Lymphotoxin entweder direkt innerhalb von Minuten oder indirekt über ein Anschwellen des Zytoplasmas zur Zellyse (38, 106, 140, 141). Im Elektronenmikroskop können Partikelansammlungen auf der Plasmamembran beobachtet werden (25). Größe und Form der Mikrovilli sind verändert. Der Proteingehalt der Plasmamembran nimmt ab, der Lipidgehalt zu. Die osmotische Resistenz der Zelle ist trotz intakter Na-K-Pumpe vermindert (103). Die Calcium-Aufnahmerate in die Zelle soll erhöht sein (89).

Die zytotoxische Wirkung von Lymphotoxin ist Komplement-unabhängig (30), durch hochmolekulares Dextran hemmbar (126) und durch gleichzeitige Inkubation der Indikatorzellen mit Actinomycin D (104), DNP, Puromycin und Cycloheximid (140) zu verstärken. Der frühe Anstieg der RNS- und hier vor allem der mRNS-Synthese (69) in der Indikatorzelle unter Lymphotoxin-Einfluß soll ein aktiver Reparaturmechanismus sein (104). Wird dieser RNS-Syntheseanstieg mit Actinomycin D gehemmt, so potenziert sich die zytotoxische Wirkung von Lymphotoxin (104). α -Lymphotoxin soll RNase-Aktivität haben (72).

Die einzelnen Indikatorzellen und -zelllinien zeigen für Lymphotoxin unterschiedliche Sensibilität. Mögliche Erklärungen hierfür sind neben aktiven Reparaturmechanismen, natürliche Resistenz der Zellmembran, Fehlen und Maskieren von Zellmembranrezeptoren (125, 141), Serum und Zelloberflächenkomponenten (67, 77, 78) und unterschiedliche Rezeptortypen (low-capacity, high-affinity = "specific" und high-capacity, low-affinity = "non-specific") der Zielzellen (12).

1.3 Problemstellung

Der in einer Lymphozytenkultur durch Mitogenstimulation induzierte Prozess der Zellproliferation und Biosynthese wird heute aus der Wechselwirkung einzelner Zelltypen wie Suppressor-, Helfer- und Killerzellen untereinander zusammen mit den von ihnen gebil-

deten "Mediatoren" verstanden (57). Dabei stellt die Lymphotoxin-Bildung nur einen Teilaspekt dieses komplexen Geschehens dar.

Die vorliegende Arbeit wird diesen interzellulären Regulationsmechanismus weitgehend unberücksichtigt lassen. Vielmehr soll an einem vereinfachten Modell "Lymphozyt + Mitogen $\rightarrow$ Lymphotoxin" durch gezielte Blockierung einzelner biochemischer Schritte die Abhängigkeit der mitogeninduzierten Lymphotoxin-Bildung bzw. -Sekretion menschlicher Lymphozyten von der Makromolekülsynthese untersucht werden.

Als Hemmstoffe der DNS-Synthese verwendeten wir Mitomycin C und Hydroxyurea, als Hemmstoff der DNS-abhängigen RNS-Synthese Actinomycin D, als Hemmstoffe der zytoplasmatischen Proteinsynthese Puromycin, Cycloheximid und Emetin, als Hemmstoff der mitochondrialen Proteinsynthese Chloramphenicol und als Hemmstoff des Membranstoffwechsels und der Mikrofilamentenaktivität Cytochalasin B (siehe auch 2a).

Da wir annehmen konnten, daß alle diese Stoffe in hoher Dosierung neben ihren spezifischen auch unspezifische Wirkungen haben, wurde in Dosiswirkungsstudien zunächst die niedrigste effektive Dosis ermittelt. Diese Konzentration wurde anschließend in Kinetik-Studien eingesetzt, um die Hemmbarkeit und Regulation der Lymphotoxin-Bildung zu untersuchen. Eine weitere Fragestellung war die mögliche Verstärkung der Zytotoxizität von Lymphotoxin auf die Indikatorzellen durch die Stoffwechselinhibitoren.

Bei diesen Untersuchungen wurde nicht zwischen den einzelnen Lymphotoxin-Klassen unterschieden; vielmehr wurde die gesamte zytotoxische Aktivität, die im zellfreien Medium stimulierter Lymphozyten-Kulturen nachweisbar ist, als Lymphotoxin-Aktivität bezeichnet und der Einfluß der Hemmstoffe auf diese Gesamtktivität beurteilt.

2 Materialien

2.1 Präparate und Zellen

Medium RPMI 1640, Penicillin G, Streptomycin (Gibco, Glasgow);
Eagle's Minimum Essential Medium, fetales Kälberserum, Trypsin,
Glutamin (Flow, Bonn);
Humanserum (Blutbank des Bayerischen Roten Kreuzes, München);
Heparin 5000 E/ml, Lymphoprep^R (Apotheke der Klinischen Uni-
versitätsanstalten, München);
Bacto-Phyto-Hämagglutinin-P (Difco, Detroit);
Concanavalin A (Sigma Chemical Company, St.Louis);
6-3H-Thymidin, spez. Aktivität 5 mCi/ml (Amersham-Buchler,
Braunschweig);
Dextran 200.000 - 300.000 MG (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala);
Toluol, Ethylendiamin-Tetraacetat EDTA (Merck, Darmstadt);
2,5-Diphenyloxazol PPO (Koch-Light Laboratories, Ltd. Coinbrocks,
England);
Cycloheximid, Mitomycin C, Cytochalasin B (Serva, Heidelberg);
Hydroxyurea 76,1 MG, Emetin-2HCL 553,6 MG, Chloramphenicol
323,14 MG (Boehringer, Mannheim);
Dactinomycin (Merck Sharp & Dohm, München);
Linbro-Gewebekulturplatten Nr. FB 96-Tc, Filterpapier für
Skatron (Flow, Bonn);
Polystyrol-Teströhrchen 12 x 75 mm (Falcon Plastics, Oxnard);
Zellulose-Azetat-Membranfilter Nr. SM 111-06025 (Sartorius,
Göttingen);
Dialyseschlauch Viskin 8-32, Ø 7 mm, 8 mm breit, Wandstärke
0,05 mm, Porengröße 15-20 = Molekulargröße 10.000 - 20.000
Dalton (Unioncarbide Corp., Chicago).

Zellen:

Lymphozyten von gesunden Probanden, aus venösem Blut nach der
unter 3.1 beschriebenen Methode gewonnen;
HeLa-Zell-Linien S₃ und 229 (Flow, Bonn).

2.2 Apparative Hilfsmittel

Die Szintillationsspektrometrie wurde mit einem Flüssigkeits-szintillationszähler (Fa. Packard, Modell B 2450) durchgeführt.

Das Gerät stellte die Deutsche Krebshilfe zur Verfügung.

Die radioaktiv-markierte DNS von Lymphozyten wurde mit einem Vielfachfiltriergerät (Fa. Hölzel, München) an Zellulose-Azetat-Membranfilter gebunden.

Die radioaktiv-markierte DNS der Indikatorzellen wurde mit einem Multiple Cell-Culture Harvester (Skatron AS, Heggtopen, Lierbyen) auf Filterpapier übertragen.

Alle Inkubationen erfolgten in einem Inkubator Typ KD 600 K CO₂ (Fa. Heraeus).

2.3 Zubereitung bestimmter Präparate

100 mg Bacto-Phyto-Hämagglutinin-P (PHA) wurden in 5 ml Medium RPMI 1640 gelöst und durch weitere Zugabe von Medium RPMI 1640 1:40 verdünnt. 100 mg Concanavalin A (Con A) wurden in 5 ml Medium RPMI 1640 gelöst und mit demselben Medium 1:32 verdünnt. Die Lösungen in Polystyrol-Teströhrchen gefüllt wurden bis zum Gebrauch bei -18°C eingefroren.

Dextran wurde als 6 %-ige Lösung in physiologischer Kochsalzlösung verwendet.

6-3H-Thymidin mit einer spezifischen Aktivität von 5 mCi/ml wurde mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt und bei 4°C aufbewahrt. Unmittelbar vor Gebrauch wurde es mit Medium RPMI 1640 für Lymphozyten-Kulturen bzw. mit Minimum Essential Medium für Indikatorzell-Kulturen auf 1:100 verdünnt.

Die Szintillationsflüssigkeit wurde aus 5 g PPO/l Toluol hergestellt.

2.4 Zusammensetzung der Medien

Das Kulturmedium RPMI 1640 für die Lymphozyten-Kulturen wurde durch Anreicherung von Medium RPMI 1640 mit Humanserum (10 %), 0,04 mM/ml Glutamin, 100 E/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin hergestellt.

Ein mit fetalem Kälberserum (10 %), 100 E/ml Penicillin G, 0,04 mM/ml Glutamin und 100 µg/ml Streptomycin angereichertes Minimum Essential Medium wurde für die Indikatorzell-Kulturen als Kulturmedium MEM verwendet.

Kontrollmedium ist das zellfreie Kulturmedium RPMI 1640 von nicht-stimulierten Lymphozyten-Kulturen.

Lymphotoxin-Medium ist das zellfreie Kulturmedium RPMI 1640 von stimulierten Lymphozyten-Kulturen. Die zytotoxische Eigenschaft dieses Mediums wird als Lymphotoxin-Aktivität bezeichnet.

2.5 Herstellung der Stoffwechsellinhibitor-Lösungen

1. Mitomycin C-Stammlösung: 2 mg in 4 ml RPMI 1640 (500 µg/ml); Verdünnungen von 500 bis 5×10^{-4} µg/ml wurden getestet.
2. Emetin-Stammlösung: 7 mg in 7 ml RPMI 1640 (1 mg/ml); bei einem MG von 553,6 entspricht dies 1,8 mM; Verdünnungen von 1,8 bis $1,8 \times 10^{-6}$ mM wurden getestet.
3. Hydroxyurea-Stammlösung: 1 g in 13,14 ml RPMI 1640 (1M); Verdünnungen von 1 bis 1×10^{-6} M wurden getestet.
4. Chloramphenicol-Stammlösung: 1 g in 10 ml Aqua bidest (100 mg/ml), bei einem MG von 323,14 entspricht dies 310 mM; Verdünnungen von 310 bis $3,1 \times 10^{-4}$ mM wurden getestet.
5. Actinomycin D-Stammlösung: 0,5 mg in 5 ml RPMI 1640 (100 µg/ml); Verdünnungen von 100 bis 10^{-3} µg/ml wurden getestet.
6. Cycloheximid-Stammlösung: 100 mg in 1 ml Aceton (100 mg/ml); Verdünnungen von 100 bis 10^{-4} mg/ml wurden getestet.

Die Stammlösungen wurden alle mit RPMI 1640 weiterverdünnt.

3 Methodik

Für diese Arbeit wurden die Methoden von EIFE und Mitarbeitern (17, 19) übernommen.

Lymphozyten wurden in Suspensions-Kulturen stimuliert und

1. die Lymphoproliferation (DNS-Synthese) und
2. die Lymphotoxin-Bildung gemessen.

Nach Inkubation mit Stoffwechsellinhibitoren wurde deren Einfluß auf

1. die induzierte Lymphoproliferation (DNS-Synthese) und
2. die induzierte Lymphotoxin-Bildung bestimmt.

3.1 Gewinnung und Kultivierung von Lymphozyten

Leukozyten bzw. Lymphozyten wurden aus dem venösen Blut gesunder Probanden gewonnen.

Leukozyten-Suspension:

Nach Heparinisierung (0,02 ml Heparin/ml) wurde zur Sedimentation der Erythrozyten das Blut mit 6 %-igem Dextran (1 Teil Dextran auf 4 Teile Blut) gemischt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Plasma mit den Leukozyten wurde abgehoben, 10 Minuten bei 100 g zentrifugiert und das zellfreie Plasma/Dextran-Gemisch verworfen. Nach Suspension der Zellen in Medium RPMI 1640 wurden sie bei 40 g nochmals zentrifugiert und in Abhängigkeit vom Ausgangsvolumen des Blutes in 2-5 ml Medium RPMI 1640 resuspendiert. In einer Neubauer-Zählkammer erfolgte die Differenzierung in mono- und polynukleäre Zellen.

Lymphozyten-Suspension:

Lymphoprep^(R) wurde mit 1:1 verdünntem, heparinisiertem Blut überschichtet und für 40 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Die lymphozytenreiche Zwischenphase an der Grenzfläche zwischen Blut und Lymphoprep^(R) wurde vorsichtig abgehoben und zweimal gewaschen.

Leukozyten- und Lymphozyten-Kulturen:

Mit Kulturmedium RPMI 1640 wurde eine Zellsuspension mit $1,3 \times 10^5$ Lymphozyten/ml hergestellt. 1,5 ml dieser Zellsuspension in 12 x 75 mm Kulturröhrchen gefüllt enthielten neben 200.000 Lymphozyten nach Dextran-Separation einen variablen Anteil an Granulozyten, abhängig vom Differentialblutbild des Spenders zur Zeit der Blutabnahme, nach Ficoll-Separation mindestens 90 % Lymphozyten und wenige Monozyten.

Nach EIFE (15) stören eventuell vorhandene Granulozyten-Toxine den Nachweis von Lymphotoxin im DNS-Synthese-Hemmtest nicht. Daher wurden die Lymphozyten nicht immer von den anderen Leukozytenformen getrennt. Im Folgenden wird nicht zwischen Leukozyten- und Lymphozyten-Kulturen unterschieden.

3.2 Lymphozyten-Stimulation

Die Lymphozyten wurden durch Zugabe von 0,1 ml PHA 1:40 verdünnt (entspricht 50 µg PHA pro 1,5 ml Lymphozyten-Kultur) oder von 0,1 ml Con A 1:32 verdünnt (entspricht 62 µg Con A pro 1,5 ml Kulturvolumen) stimuliert. Kontrollkulturen erhielten anstelle PHA bzw. Con A zum Volumenausgleich die gleiche Menge Medium RPMI 1640. Für jeden Einzeltest wurden in der Regel drei Proben angesetzt. Die Teströhrchen wurden locker verschlossen und aufrecht stehend bei 37°C in feuchter Atmosphäre mit 5% CO₂ und 95 % Luft inkubiert.

3.3 Dosiswirkungsstudien

Zum Zeitpunkt der Lymphozyten-Stimulation wurde den Kulturen je 0,1 ml einer Verdünnung des Stoffwechsellinhibitors zugegeben und während der 3-tägigen Inkubationsdauer auf den Kulturen belassen. Bei einem Endvolumen von 1,7 ml je Kultur wurde der

Inhibitor 17-fach verdünnt. Kontrollkulturen wurden entweder ohne Stoffwechselinhibitor stimuliert oder erhielten unstimuliert den Hemmstoff. Mit jeweils 0,1 ml RPMI 1640 wurde in diesen Kulturen das Endvolumen von 1,7 ml erreicht.

3.4 Kinetikstudien

Lymphotoxin-Kinetik:

Die Kinetik des Lymphotoxin-Gehalts stimulierter Lymphozyten-Kulturen wurde während einer 3-tägigen Inkubation ermittelt. Hierzu wurden aus mit 50 µg PHA- bzw. 62 µg Con A-stimulierten Parallelkulturen (200.000 Lymphozyten/1,5 ml) eines Spenders zu verschiedenen Zeiten je 0,05 ml zellfreies Medium abgehoben und gepoolt. Den Kontrollkulturen wurde anstelle der PHA- bzw. Con A-Lösung 0,1 ml RPMI 1640 zugesetzt.

Lymphotoxin-Kinetik in Anwesenheit von Stoffwechsel-Inhibitoren:

Es wurde der Einfluß von Stoffwechselinhibitoren auf die induzierte Lymphotoxin-Bildung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt ihrer Zugabe untersucht.

Hierzu wurden Parallelkulturen (200.000 Lymphozyten/1,5 ml) eines Spenders mit 50 µg PHA bzw. 62 µg Con A stimuliert. Die unstimulierten Kontrollkulturen erhielten zum Volumenausgleich 0,1 ml RPMI 1640. Zu verschiedenen Zeiten nach Stimulationsbeginn wurde sowohl einer stimulierten als auch einer Kontrollkultur je 0,1 ml einer Inhibitorlösung konstanter Konzentration zugegeben und weiter inkubiert. Die Lymphoproliferation und die Lymphotoxin-Bildung wurden nach insgesamt 3-tägiger Inkubation ermittelt.

3.5 Bestimmung der Lymphoproliferation (DNS-Synthese)

Nach 69 Stunden Inkubation wurden die Lymphozyten-Kulturen 10 Minuten bei 40 g zentrifugiert. Aus den zellfreien Überständen wurde je Probe 1.0 ml vorsichtig abgehoben, steril in Röhrchen gefüllt und bis zur Bestimmung des Lymphotoxin-Gehalts bei -18°C eingefroren. Das Sediment ließ man nach Zugabe von 1.0 μCi 3H-Thymidin/Kultur für weitere drei Stunden inkubieren. Schnelles Abkühlen der Kulturen auf 0°C im Eisbad beendete den Einbau des 3H-Thymidins in die DNS der Lymphozyten. Mit einem Vielfachfiltriergerät wurden die Zellen mit physiologischer Kochsalzlösung auf Zellulose-Azetat-Membranfilter gewaschen. Die Filter wurden mit Trichloressigsäure und Äthanol gespült und getrocknet. Die an den Filtern gebundene Radioaktivität wurde nach Zugabe von 8 ml Szintillatorflüssigkeit im Szintillationsspektrometer als counts per minute (cpm) gemessen. Die Differenz der Radioaktivität von stimulierten zu nichtstimulierten Kulturen wurde als Maß der Mitogen-induzierten Lymphoproliferation gewertet.

3.6 Dialyse der zellfreien Lymphozyten-Kulturmedien

Um im DNS-Synthese-Hemmtest nur den Lymphotoxin-Einfluß zu ermitteln, muß der Stoffwechsellinhibitor aus dem zellfreien Medium entfernt werden.

Die steril durchgeführte Trennung erfolgte mit Viskin-Dialysesschläuchen, die zuvor eine Stunde in 0,1 molarer EDTA ausgekocht worden waren. Je 0,5 ml der zellfreien Medien wurden in die Schläuche pipettiert. Während 24-36 Stunden wurden die Schläuche in Medium RPMI 1640 bei 37°C mit einem Magnetrührer ständig bewegt. Die Dialyseflüssigkeit wurde alle drei Stunden erneuert. Anschließend wurde das zellfreie Medium wieder in Teströhrchen gefüllt und die Lymphotoxin-Aktivität im DNS-Synthese-Hemmtest bestimmt.

3.7 Lymphotoxin-Nachweis im DNS-Synthese-Hemmtest

Für den Nachweis von Lymphotoxin wurden HeLa-Zellen der Linien S₃ und 229 benutzt. Sie wurden als Vorratskulturen in 275 ml Flaschen in Kulturmedium MEM gezüchtet und zweimal wöchentlich rekultiviert.

Die als Monolayer wachsenden Zellen wurden mit Trypsin gelöst, kräftig pipettiert und mit MEM zu einer Einzelzellsuspension (1×10^5 Zellen/ml) verdünnt. Auf Linbro-Gewebekultur-Platten wurden Indikatorzell-Kulturen mit je 1×10^4 Zellen pro Mikrovertiefung angesetzt. Nach 24-stündiger Vorinkubation in feuchter Atmosphäre mit 5 % CO₂ und 95 % Luft wurden die HeLa-Zellen mit je 0,05 ml des zellfreien Mediums der Lymphozyten-Kulturen beschickt und für weitere 45 Stunden inkubiert. Anschließend wurde den Kulturen je 0,5 µCi 3H-Thymidin in 0,05 ml Kulturmedium MEM zugegeben und die Inkubation für drei Stunden fortgesetzt. Abgießen des Mediums beendete den Tritium-Einbau in die DNS. Nach Lösen der HeLa-Zellen mit Trypsin (0,2 ml Trypsin/Kultur) wurden sie mit einem Multiple Cell-Culture-Harvester mit 0,9 %-iger Kochsalzlösung auf Zellulose-Azetat-Membranfilter gewaschen. Die Filter wurden getrocknet und die nach dem Waschen auf den Filtern verbleibende Radioaktivität wurde nach Zugabe von 4 ml Szintillatorflüssigkeit gemessen. Inkubation der HeLa-Zellen mit Medium von stimulierten Lymphozyten verringert die Aufnahme von 3H-Thymidin in die DNS. Dies wurde als Nachweis der Lymphotoxin-Aktivität gewertet.

3.8 Berechnung der Lymphotoxin-Aktivität

Ermittlung der Aktivität im DNS-Synthese-Hemmtest:

Die Aktivität von Lymphotoxin im DNS-Synthese-Hemmtest wird nach folgender Formel berechnet:

$$1 - \frac{\text{cpm der Kulturen mit Lymphotoxin-Medium}}{\text{cpm der Kulturen mit Kontroll-Medium}} \times 100 = \% \text{-Hemmung}$$

Die cpm geben die 3H-Thymidin-Aufnahme in die DNS der Indikatorzellen an.

Berechnung der Lymphotoxin-Einheiten:

Alle Medien (Lymphotoxin- und Kontroll-Medien) wurden zweifach serienverdünnt und die Lymphotoxin-Aktivität jeder Verdünnung in %-Hemmung bestimmt (siehe Formel oben). Für jeden einzelnen Versuch wurde die in Inhibitor-freien, stimulierten Kulturen gefundene Aktivität als 100 % relative Lymphotoxin-Einheiten definiert und mittels deren Verdünnungsreihe eine Eichkurve festgelegt. Die toxische Aktivität der übrigen Medien des gleichen Versuchs wurde dann mit Hilfe der Eichkurve ermittelt und in relativen Lymphotoxin-Einheiten ausgedrückt.

3.9 Untersuchungen zur Interferenz von Lymphotoxin und Stoffwechsellinhibitoren im DNS-Synthese-Hemmtest

Es sollte untersucht werden, ob verschiedene Konzentrationen von Stoffwechsellinhibitoren den Nachweis von Lymphotoxin im DNS-Synthese-Hemmtest beeinflussen.

Hierzu wurden auf Linbro-Gewebe-Kulturplatten HeLa-Zell-Kulturen mit je 1×10^4 Zellen/0,1 ml angesetzt und 24 Stunden vorinkubiert. Aus den Verdünnungen der Stoffwechsellinhibitoren wurden je 0,1 ml in 1,5 ml Kulturmedium RPMI 1640 gelöst (16-fache Verdünnung). Hiervon wurden den Indikatorzell-Kulturen zusammen mit 0,05 ml eines Lymphotoxin-Standards (10, 50 und 100 Einheiten) 0,05 ml zugegeben (4-fache Verdünnung). Kontrollkulturen erhielten nur den Stoffwechsellinhibitor oder nur Lymphotoxin. Nach 45 Stunden wurde die DNS-Synthese der HeLa-Zellen bestimmt.

4 Experimentelle Untersuchungen

4.1 Mitomycin C

4.1.1 Der Wirkungsmechanismus von Mitomycin C (Literatur)

Mitomycin C, bekannt seit 1958 (132) hemmt irreversibel die Proliferation von Eu- und Prokaryonten. Das durch Reduktion aktivierte Mitomycin C-Molekül (122,137) reagiert mit verschiedenen Zellkomponenten (121, 137).

Mitomycin C alkyliert die DNS unabhängig von ihrem funktionellen Zustand (107). Aufgrund seiner hohen Affinität zu Guanin geht es mit dieser Base eine kovalente Bindung ein (121). Bei jeder 5.-10. Bindung reagiert Mitomycin C mit beiden DNS-Strängen und bindet so die komplementäre DNS aneinander (58). Diese Quervernetzung ist irreversibel (121). In Abhängigkeit von Konzentration des Inhibitors, Inkubationsdauer, Zellspezies und Gehalt der DNS an Guanin (81) treten Quervernetzungen verschieden häufig auf (58). In Säugetierzellen ist nicht die gesamte DNS strukturell der Alkylierung zugänglich.

Die Quervernetzung der DNS-Stränge bildet für die Replikation ein sterisches Hindernis (58); die DNS-Synthese wird irreversibel gehemmt. Die Gesamttranskriptionsfähigkeit bleibt in beachtlichem Maß bestehen (107), da nur einzelne Gene statistisch betroffen sind, oder soll anfangs sogar verstärkt sein (119).

Das Auftreten von DNS-Fragmenten (61, 101) wird zurückgeführt auf einen Aktivitätsanstieg von Excisions- und Repair-Enzymen (6, 124) und eine durch Mitomycin C induzierte DNase-Aktivität (63, 86, 119). Eine Kumulation von Okazaki-Vorstufen der hochpolymeren DNS durch Hemmung der Synthese neuer DNS-Moleküle wird ebenfalls diskutiert (100, 101).

Nach längerer Inkubationsdauer und in höheren Konzentrationen beeinflusst Mitomycin C auch die DNS-abhängige RNS-Synthese und die Protein-Synthese (111, 116). So hemmte Mc GREGOR mit 50 µg Mitomycin C/ml die DNS- und RNS-Synthese in Rattenlymphozyten um 50 %, die Protein-Synthese um 20 % (83). In einer anderen

Arbeit wurde mit 100 µg Mitomycin C/ml bei blockierter DNS-Replikation die RNS-Synthese von Meerschweinchen-Lymphozyten um 90 %, die Protein-Synthese um 50 % gehemmt (121). In älteren Untersuchungen unseres Labors an Human-Lymphozyten erzielte EIFE mit 50 und 100 µg Mitomycin C/ml eine 100 %-ige Hemmung der DNS-Synthese bzw. Lymphoproliferation bei unbeeinflusster Lymphotoxin-Bildung (15).

Die sRNS-Synthese ist gegenüber Mitomycin C weniger empfindlich als die der rRNS und mRNS (107). Mitomycin C desaggregiert Ribosomen. Im Sedimentationsprofil fehlen die Polyrribosomen, der Anteil der großen Ribosomen-Untereinheiten nimmt zugunsten der kleineren Einheiten ab (73, 120). An sRNS und rRNS komplex gebundene DNasen werden aktiviert (62).

Die Kinetik der Synthesehemmung induzierter (bakterieller) Enzyme entspricht der Hemmung der mRNS-Synthese. Die Kinetik der Proteinsynthese-Hemmung hängt von der Geschwindigkeit, mit der Mitomycin C die DNS alkyliert, und von der Lebensdauer der für das Enzym spezifischen mRNS ab (8). Andere Autoren beschreiben eine Hemmung der Proteinsynthese (menschlicher Tumorzellen) auf Translationsebene. Mitomycin C soll eine in den Ribosomen latent vorliegende RNase aktivieren, die die mRNS zerstört (74).

Mitomycin C ist in niedriger Dosierung ein schnell wirkender und selektiver Inhibitor der DNS-Synthese (121). Die Hemmung der RNS- und der Protein-Synthese ist Folge der DNS-Alkylierung und deren Verlust als Matrix für die Transkription. Welche Rolle hierbei die direkte Reaktion zwischen Mitomycin C und RNS spielt, ist bisher noch nicht hinreichend geklärt.

4.1.2 Die Wirkung von Mitomycin C auf die Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation (Dosiswirkungsstudie)

Mit Mitomycin C untersuchten wir die Abhängigkeit der Lymphotoxin-Bildung von der DNS-Synthese. Wir stellten uns die Frage, ob Dosen von Mitomycin C, welche nur die Replikation hem-

men, auch die Lymphotoxin-Bildung beeinflussen, weil z.B.

a) die Replikation zur Genanschaltung nötig ist oder b) proliferierende Helferzellen im Gemisch gebraucht werden.

Hierzu wurden Lymphozyten mit PHA (50 $\mu\text{g}/\text{Kultur}$) stimuliert und mit verschiedenen Konzentrationen von Mitomycin C inkubiert. Kontrollkulturen erhielten entweder nur PHA, nur Mitomycin C oder blieben unbehandelt. Im Gegensatz zu der in der Literatur beschriebenen kurzzeitigen (10 - 30 Minuten) Inkubation beließen wir Mitomycin C während der gesamten 3-tägigen Inkubationsdauer in der Kultur. Anschließend wurde im zellfreien Medium die Lymphotoxin-Aktivität bestimmt. Da sowohl Mitomycin C als auch Lymphotoxin das Wachstum der Indikatorzellen (HeLa-Zellen) beeinflussen (70), wurde Mitomycin C durch Dialyse aus dem zellfreien Medium entfernt (siehe Abschnitt: Interferenz von Mitomycin C und Lymphotoxin im DNS-Synthese-Hemmtest). Nach Abheben der zellfreien Kulturmedien zur Lymphotoxin-Messung, wurde in den verbleibenden ungewaschenen Lymphozyten die DNS-Synthese ermittelt.

Die Wirkung von Mitomycin C auf die Lymphotoxin-Bildung
Lymphotoxin-haltige Medien aus Mitomycin C-freien Kulturen verringern den ^3H -Thymidin-Einbau in HeLa-Zellen von 9.548 auf 2.109 cpm (Exp. A) bzw. von 10.456 auf 2.092 cpm (Exp. B). Dies entspricht einer Hemmung von 78 % (Exp. A) bzw. 80 % (Exp. B) oder per definitionem je 100 (relativen) Lymphotoxin-Einheiten. Mit niedrigen Mitomycin C-Konzentrationen (3×10^{-5} bis 3×10^{-2} $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubierte Lymphozyten-Kulturen zeigen in ihren Überständen eine Zunahme der Lymphotoxin-Aktivität bis auf 160 (Exp. A) bzw. 130 Lymphotoxin-Einheiten (Exp. B). Nach Inkubation mit 3×10^{-1} μg Mitomycin C/ml wird ebensoviel Lymphotoxin wie in der Kontrollkultur (ohne Mitomycin C) gebildet. Erst 3 μg Mitomycin C/ml hemmen die Lymphotoxin-Bildung (Tab. 4.1.2.1 und Tab. 4.1.2.2).

Die Wirkung von Mitomycin C auf die Lymphoproliferation
Mitomycin C hat in Konzentrationen von 3×10^{-5} bis 3×10^{-3} $\mu\text{g}/\text{ml}$ keinen eindeutigen Einfluß auf die Lymphoproliferation. Erst ab einer Dosis von 3×10^{-2} $\mu\text{g}/\text{ml}$ hemmt es die DNS-Synthese

Tab. 4.1.2.1: Wirkung von Mitomycin C auf die Lymphotoxin-Bildung (Experiment A)

Mitomycin C µg/ml ¹⁾	DNS-Synthese-Hemmtest (cpm 3H-Thymidin-Einbau)		Lymphotoxin-Aktivität Einheiten ⁴⁾
	Kontroll-Medium ²⁾	Lymphotoxin-Medium ³⁾	
0	9.548 ± 3410 ⁵⁾	2.109 ± 650 (-78%) ⁶⁾	100 (80-129)
3 x 10 ⁻⁵	6.713 ± 515	809 ± 172 (-88%)	144 (129-161)
3 x 10 ⁻⁴	8.784 ± 547	752 ± 8 (-91%)	161 (161-167)
3 x 10 ⁻³	8.329 ± 1096	1.000 ± 20 (-88%)	144 (140-150)
3 x 10 ⁻²	9.749 ± 1991	1.167 ± 158 (-88%)	144 (134-156)
3 x 10 ⁻¹	11.621 ± 11	2.330 ± 584 (-80%)	108 (90-129)
3	9.333 ± 2078	5.178 ± 307 (-45%)	30 (25-33)

Legende:

- 1) µg Mitomycin C pro ml Lymphozyten-Kultur;
- 2) dialysiertes Medium unstimulierter Lymphozyten-Kulturen;
- 3) dialysiertes Medium stimulierter Lymphozyten-Kulturen;
- 4) Lymphotoxin-Aktivität in Einheiten, berechnet aus der %-Hemmung der DNS-Synthese in den Indikatorzell-Kulturen (siehe Kap. 3.8);
- 5) cpm 3H-Thymidin-Aufnahme/Indikatorzell-Kultur nach Inkubation mit den Lymphozyten-Medien: Mittelwerte von Dreifachbestimmungen + Standardabweichung;
- 6) Hemmung der Indikatorzell-DNS-Synthese in %, berechnet aus der Abnahme der cpm in den Kulturen mit Lymphotoxin-Medium bezogen auf die cpm in den Kulturen mit Kontroll-Medium.

Tab. 4.1.2.2: Wirkung von Mitomycin C auf die Lymphotoxin-Bildung (Experiment B)

Mitomycin C µg/ml ¹⁾	DNS-Synthese-Hemmtest (cpm 3H-Thymidin-Einbau)		Lymphotoxin-Aktivität Einheiten ⁴⁾
	Kontroll-Medium ²⁾	Lymphotoxin-Medium ³⁾	
0	10.456 ± 239 ⁵⁾	2.092 ± 247 (-80%) ⁶⁾	100 (91-108)
3 x 10 ⁻⁵	11.149 ± 99	1.487 ± 140 (-87%)	124 (123-132)
3 x 10 ⁻⁴	11.611 ± 203	1.437 ± 50 (-88%)	132 (127-132)
3 x 10 ⁻³	10.625 ± 269	n.t. ⁷⁾	n.t. ⁷⁾
3 x 10 ⁻²	10.544 ± 226	1.650 ± 110 (-84%)	115 (111-119)

Legende:

- 1) Mitomycin C-Konzentration in µg pro ml Lymphozyten-Kultur;
- 2) dialysiertes Medium unstimulierter Lymphozyten-Kulturen;
- 3) dialysiertes Medium stimulierter Lymphozyten-Kulturen;
- 4) Lymphotoxin-Aktivität in Einheiten, berechnet aus der %-Hemmung der DNS-Synthese in den Indikatorzell-Kulturen (siehe Kap. 3.8);
- 5) cpm 3H-Thymidin-Aufnahme/Indikatorzell-Kultur nach Inkubation mit den Lymphozyten-Medien: Mittelwerte von Dreifachbestimmungen ± Standardabweichung;
- 6) Hemmung der Indikatorzell-DNS-Synthese in %, berechnet aus der Abnahme der cpm in den Kulturen mit Lymphotoxin-Medium, bezogen auf die cpm in den Kulturen mit Kontroll-Medium;
- 7) nicht getestet (technischer Fehler).

Tab. 4.1.2.3:

Die Wirkung von Mitomycin C auf die PHA-induzierte Lymphoproliferation

Experiment A:

<u>Mitomycin C</u>	<u>Lymphoproliferation</u>		
$\mu\text{g/ml}$	cpm 3H-Thymidin-Einbau	% - Hemmung	
0	16.362 $\pm$ 3046 (96)	0	
3 x 10 ⁻⁵	25.197 $\pm$ 3066 (101)	0 ⁺)	
3 x 10 ⁻⁴	31.271 $\pm$ 2430 (99)	0 ⁺)	
3 x 10 ⁻³	26.060 $\pm$ 1532 (114)	0 ⁺)	
3 x 10 ⁻²	9.417 $\pm$ 1366 (123)	42	
3 x 10 ⁻¹	1.198 $\pm$ 105 (81)	93	
3	58 $\pm$ 12 (34)	100	
30	70 $\pm$ 43 (19)	100	

Experiment B:

<u>Mitomycin C</u>	<u>Lymphoproliferation</u>		
$\mu\text{g/ml}$	cpm 3H-Thymidin-Einbau	% - Hemmung	
0	46.662 $\pm$ 5733 (53)	0	
3 x 10 ⁻⁵	40.317 $\pm$ 1280 (55)	14	
3 x 10 ⁻⁴	32.806 $\pm$ 1244 (90)	30	
3 x 10 ⁻³	40.034 $\pm$ 309 (96)	14	
3 x 10 ⁻²	6.338 $\pm$ 130 (77)	84	

Legende:

Lymphoproliferation angegeben als Mittelwert von Dreifachbestimmungen + Standardabweichung der cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Lymphozyten-Kulturen nach Stimulation mit 50 μg PHA/Kultur; in Klammern: cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in nicht-stimulierte Kontroll-Kulturen (spontane Lymphoproliferation).

Mitomycin C-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$ Lymphozyten-Kultur.

+) Höhere 3H-Thymidin-Einbau-Rate als in der Kontroll-Kultur ohne Mitomycin C.

der Lymphozyten; in höheren Konzentrationen blockiert es sie völlig. Die erhöhte 3H-Thymidin-Aufnahme in Anwesenheit niedriger Mitomycin C-Konzentrationen in Exp. A war bei Wiederholung des Versuchs nicht zu finden (Tab. 4.1.2.3).

Vergleich der Wirkung von Mitomycin C auf Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation

Die Wirkung von Mitomycin C auf die beiden Lymphozyten-Funktionen läßt sich konzentrationsabhängig in drei Phasen einteilen:

Bei unbeeinflusster Lymphoproliferation kommt es in niedrigen Mitomycin C-Konzentrationen zu einer Steigerung der Lymphotoxin-Bildung.

Wird die Lymphoproliferation durch höhere Mitomycin C-Dosen zunehmend gehemmt, bleibt die Lymphotoxin-Synthese über bzw. auf Kontrollniveau (Kontrollkultur ohne den Inhibitor). Hier sprechen wir von der "Dissoziation": Normale bzw. sogar gesteigerte Lymphotoxin-Bildung bei gehemmter Lymphoproliferation (DNS-Synthese).

Bei völlig blockierter Lymphoproliferation wird auch die Lymphotoxin-Bildung vermindert. Eine komplette Hemmung der Lymphotoxin-Bildung konnten wir in dem untersuchten Konzentrationsbereich jedoch nicht nachweisen.

Entscheidend ist, daß die Lymphotoxin-Synthese erst bei höheren Mitomycin C-Konzentrationen, welche die DNS-Synthese völlig blockieren, abnimmt, jedoch auch hier noch im Medium eine Restaktivität von 30 Lymphotoxin-Einheiten nachweisbar bleibt. Somit erscheint die Lymphotoxin-Bildung zumindest partiell von einer intakten Replikation unabhängig zu sein (Abb. 4.1.2).

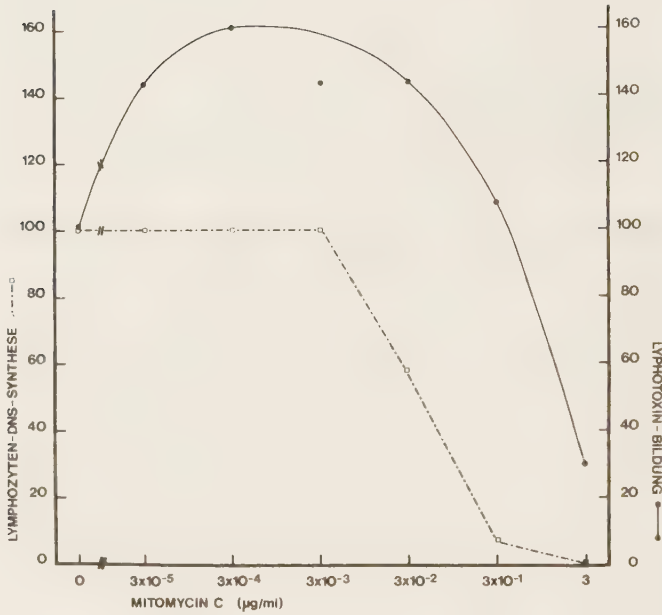


Abb. 4.1.2: Die Wirkung von Mitomycin C auf die Lymphotoxin-Bildung und PHA-induzierte Lymphoproliferation

Abszisse: Mitomycin C in µg/ml Lymphozyten-Kultur

Ordinate links und gestrichelte Kurve: Lymphozyten-DNS-Synthese angegeben in % ³H-Thymidin-Aufnahme

Ordinate rechts und durchgezogene Kurve: Lymphotoxin-Bildung angegeben in Lymphotoxin-Einheiten (s. Kap. 3.8) gemessen im DNS-Synthese-Hemmtest.

Jeder Punkt gibt den Mittelwert von Dreifachbestimmungen an.

4.1.3 Die Interferenz von Lymphotoxin und Mitomycin C im DNS-Synthese-Hemmtest

Medien von Mitomycin C-behandelten und stimulierten Lymphozyten-Kulturen enthalten nach 3-tägiger Inkubation außer Lymphotoxin auch noch eine unbekannte Menge Mitomycin C. Da ein hemmender Einfluß von Mitomycin C auf die HeLa-Zell-DNS-Synthese bekannt ist, die Auswirkungen einer gleichzeitigen Inkubation der Zellen mit Mitomycin C und Lymphotoxin aber unbekannt sind, haben wir die Lymphotoxin-Wirkung im DNS-Synthese-Hemmtest in Anwesenheit des Inhibitors untersucht.

Hierzu wurden HeLa-Zell-Kulturen mit konstanten Lymphotoxin-Mengen und steigenden Mitomycin C-Dosen 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die DNS-Synthese in den Kulturen bestimmt.

Mitomycin C hemmt in Konzentrationen von $1,25 \times 10^{-3}$ bis $125 \mu\text{g/ml}$ zunehmend die DNS-Synthese der HeLa-Zellen (Tab. 4.1.3, Spalte 2: 0 Einheiten Lymphotoxin). Die Lymphotoxin-haltigen Medien verringern die DNS-Synthese entsprechend ihrer Aktivität (Tab. 4.1.3, Zeile: ohne Mitomycin C).

Die Lymphotoxin-Aktivität im DNS-Synthese-Hemmtest wird durch $1,25 \times 10^{-4}$ und $1,25 \times 10^{-3} \mu\text{g}$ Mitomycin C/ml nicht verändert (Abb. 4.1.3, Kurven b und c). Bei höheren Mitomycin C-Konzentrationen ($1,25 \times 10^{-2}$ und $1,25 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$) ist bei verminderter Empfindlichkeit der HeLa-Zellen gegenüber Lymphotoxin (%-Hemmung niedriger als in der Kontrollkultur ohne Mitomycin C) die unterschiedliche Aktivität von 10, 50 und 100 Lymphotoxin-Einheiten noch feststellbar (Abb. 4.1.3, Anstieg der Kurven d und e von links nach rechts). In höheren Konzentrationen bewirkt Mitomycin C eine so starke Hemmung der DNS-Synthese, daß der Lymphotoxin-Effekt nicht mehr meßbar ist (Abb. 4.1.3, Kurven f-h).

Diese Ergebnisse machen eine Dialyse der zellfreien Medien von Lymphozyten, die zuvor mit Mitomycin C behandelt worden waren, notwendig.

Tab. 4.1.3: Interferenz von Lymphotoxin und Mitomycin C im DNS-Synthese-Hemmtest

Mitomycin C µg/ml ¹⁾	Lymphotoxin-Aktivität			
	0 Einheiten	10 Einheiten	50 Einheiten	100 Einheiten
0	17.956 ²⁾	5.627 (-69%) ³⁾	2.878 (-84%)	2.319 (-87%)
1,25 x 10 ⁻⁴	16.039	3.119 (-74%)	2.716 (-83%)	2.164 (-87%)
1,25 x 10 ⁻³	12.709	4.351 (-66%)	3.002 (-76%)	2.043 (-84%)
1,25 x 10 ⁻²	4.051	3.123 (-23%)	3.006 (-26%)	2.634 (-35%)
1,25 x 10 ⁻¹	1.341	1.163 (-13%)	876 (-35%)	718 (-46%)
1,25	118	70	39	35
12.5	62	44	22	30
125.0	137	44	46	47

Legende:

- 1) Mitomycin C-Konzentration in µg pro ml Indikatorzell-Kultur;
- 2) cpm 3H-Thymidin-Aufnahme/Indikatorzell-Kultur: Mittelwerte von Dreifachbestimmungen; Abweichungen der Einzelwerte vom Mittelwert lagen in jedem Ansatz unter 15%;
- 3) Hemmung der DNS-Synthese in %, bezogen auf die jeweilige Kontroll-Kultur (0 Einheiten Lymphotoxin).

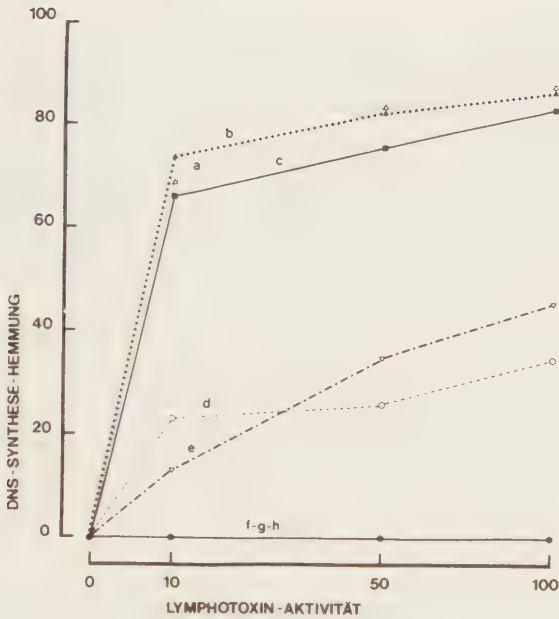


Abb. 4.1.3: Hemmung der HeLa-DNS-Synthese durch Lymphotoxin in Anwesenheit steigender Mitomycin C-Konzentrationen

Abszisse: Einheiten Lymphotoxin zugegeben zu HeLa-Zell-Kulturen

Ordinate: Hemmung (in Prozent) der HeLa-Zell-DNS-Synthese (3H-Thymidin-Aufnahme) bezogen auf die jeweilige Kontrollkultur ohne Lymphotoxin (siehe Tab. 4.1.3).

Die Kurven a - h entsprechen Kulturen:

- a) ohne Mitomycin C;
- b) mit $1,25 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ Mitomycin C/ml;
- c) mit $1,25 \times 10^{-3} \mu\text{g}$ Mitomycin C/ml;
- d) mit $1,25 \times 10^{-2} \mu\text{g}$ Mitomycin C/ml;
- e) mit $1,25 \times 10^{-1} \mu\text{g}$ Mitomycin C/ml;
- f-h) mit 1,25 bis 125 μg Mitomycin C/ml.

Jeder Punkt gibt den Mittelwert von Dreifachbestimmungen an.

4.2 Hydroxyurea

4.2.1 Der Wirkungsmechanismus von Hydroxyurea (Literatur)

Hydroxyurea, bereits 1869 zum ersten Mal synthetisiert (33), ist ein hochspezifischer, schnell wirkender Hemmstoff der DNS-Synthese und Zellteilung (65, 145). Hydroxyurea hemmt die Nukleosid-diphosphat-Reduktase und damit die Bildung der für die DNS-Synthese notwendigen Deoxyribonukleotide (24, 145).

Die Wirkung von Hydroxyurea ist auf Zellen in der S-Phase des Zellzyklus beschränkt (65, 99). Werden Zellen nur für die Dauer der G_1 - oder G_2 -Phase mit Hydroxyurea inkubiert, so beginnen nach Entfernen des Inhibitors die Zellen mit der DNS-Synthese bzw. Zellteilung (99). Bleibt der Hemmstoff über die Dauer der G_1 -Phase in der Kultur, so treten die Zellen nicht in die S-Phase ein, sondern akkumulieren am Ende der G_1 -Phase (Synchronisation) (99).

Je nach Zelltyp ist Hydroxyurea auch nach längerer Einwirkungsdauer (z.B. HeLa-Zellen bis zu 19 Stunden, Lymphozyten bis zu 50 Stunden) nicht toxisch (99, 113).

Die Wirkung von Hydroxyurea ist nach Waschen der Zellen reversibel (46, 99). Die DNS-Synthese wird wieder rasch aufgenommen und schreitet im Vergleich zur Kontrollkultur schneller fort (99). Dies wird auf Synchronisation der Zellpopulation und Verkürzung der S-Phase zurückgeführt (99).

Anfangs wurde ein Einfluß von Hydroxyurea auf RNS- und Protein-Synthese (112, 145) außer einer über die DNS indirekt bewirkten RNS-Synthese-Hemmung ausgeschlossen (99). Eine direkte Wirkung auf die Proteinbildung wird jedoch diskutiert (10).

So hemmt Hydroxyurea neben dem Uridin-Einbau in ruhenden Lymphozyten auch die Leucin-Aufnahme. Dies soll unabhängig von der DNS- und RNS-Synthese-Hemmung sein und nicht auf der Stufe der Translation geschehen (113). In Con A-stimulierten Lymphozyten wird nach 24 Stunden und 90-prozentig gehemmter DNS-Synthese die Bildung von RNS und Protein geringfügig reduziert (46).

4.2.2 Die Wirkung von Hydroxyurea auf Lymphoproliferation und Lymphotoxin-Bildung in Abhängigkeit der Konzentration (Dosiswirkungsstudie)

Mit Hydroxyurea, einem anderen Inhibitor der DNS-Synthese, der die Replikation bereits auf der Stufe der Purinsynthese hemmt, versuchten wir die bei Mitomycin C gefundene Unabhängigkeit der Lymphotoxin-Bildung von der Lymphoproliferation zu bestätigen (siehe auch Kap. 4.2.3).

PHA-stimulierte Lymphozyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Hydroxyurea inkubiert. Kontrollkulturen erhielten entweder nur PHA, nur den Inhibitor oder blieben unbehandelt. Nach 72 Stunden wurde die Lymphotoxin-Aktivität der zellfreien Medien (nach Dialyse) und die Lymphoproliferation bestimmt.

In dem in Tab. 4.2.2.1 und 4.2.2.2 wiedergegebenen Versuch hemmt Hydroxyurea die Lymphotoxin-Bildung ab einer Konzentration von $1 \times 10^{-3} \text{ M}$. Dosissteigerung führt zu einer weiteren Verminderung der Lymphotoxin-Bildung; eine vollständige Hemmung der Lymphotoxin-Bildung läßt sich jedoch in diesem Versuch nicht erreichen. Die bereits bei der niedrigsten Hydroxyurea-Dosis ($1 \times 10^{-4} \text{ M}$) beobachtete Hemmung der Lymphotoxin-Aktivität von 34 % läßt sich nach wiederholter Austestung der undialysierten Medien unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Interferenztests (Kap.4.2.4) nicht bestätigen (Tab. 4.2.2.2).

Hydroxyurea beeinflusst im Dosisbereich von 1×10^{-6} bis $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ die Lymphoproliferation nicht; $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ hemmen sie um 77 %; 1×10^{-1} und 1 M Hydroxyurea blockieren sie völlig (Tab. 4.2.2.3).

Hydroxyurea zeigt in niedrigen Konzentrationen keinen Einfluß auf Lymphoproliferation und Lymphotoxin-Bildung. In mittleren Dosen hat es auf die beiden Lymphozyten-Funktionen eine annähernd gleich große Hemmwirkung. In hohen Dosen führt es primär zu einer Hemmung der Lymphoproliferation, die Lymphotoxin-Bildung wird erst durch die nächst höhere Titerstufe vergleichbar gehemmt. Auch bei völlig blockierter Lymphoproliferation finden wir in den Medien noch eine Aktivität von 10 - 20 Lymphotoxin-Einheiten (Abb. 4.2.2).

Tab. 4.2.2.1: Wirkung von Hydroxyurea auf die Lymphotoxin-Bildung

Hydroxyurea M ¹⁾	DNS-Synthese-Hemmtest (cpm 3H-Thymidin-Einbau)		Lymphotoxin-Aktivität Einheiten ⁴⁾
	Kontroll-Medium ²⁾	Lymphotoxin-Medium ³⁾	
0	6.177 ± 70 ⁵⁾	1.097 ± 50 (-82%) ⁶⁾	100 (96-105)
1 x 10 ⁻⁴	5.299 ± 384	1.454 ± 30 (-73%)	66 (63- 66)
1 x 10 ⁻³	5.074 ± 153	1.353 ± 31 (-73%)	66 (66- 69)
1 x 10 ⁻²	4.305 ± 206	1.679 ± 107 (-61%)	37 (34- 41)
1 x 10 ⁻¹	4.870 ± 59	2.501 ± 865 (-49%)	21 (9- 47)
1	4.431 ± 206	2.951 ± 63 (-33%)	10 (10- 11)

Legende:

- 1) Hydroxyurea-Konzentration in Mol/ml Lymphozyten-Kultur;
- 2) dialysiertes Medium unstimulierter Lymphozyten-Kulturen;
- 3) dialysiertes Medium stimulierter Lymphozyten-Kulturen;
- 4) Lymphotoxin-Aktivität in Einheiten, berechnet aus der %-Hemmung der DNS-Synthese in den Indikatorzell-Kulturen (siehe Kap. 3.8);
- 5) cpm 3H-Thymidin-Aufnahme/Indikatorzell-Kultur nach Inkubation mit den Lymphozyten-Medien: Mittelwerte von Dreifachbestimmungen ± Standardabweichung;
- 6) Hemmung der Indikatorzell-DNS-Synthese in %, berechnet aus der Abnahme der cpm in den Kulturen mit Lymphotoxin-Medium bezogen auf die cpm in den Kulturen mit Kontroll-Medium.

Tab. 4.2.2.2:

Wirkung von Hydroxyurea auf die Lymphotoxin-Bildung

<u>Hydroxyurea</u> M ¹⁾	<u>DNS-Synthese-Hemmtest</u> (cpm 3H-Thymidin-Einbau)		<u>LT-Aktivität</u>
	Kontroll-Medium ²⁾	LT-Medium ³⁾	%-Hemmung ⁴⁾
0	4.515 ± 206 ⁵⁾	874 ± 34 ⁵⁾	81
1 x 10 ⁻⁶	6.538 ± 1166	743 ± 114	89
1 x 10 ⁻⁵	5.428 ± 370	818 ± 52	85
1 x 10 ⁻⁴	5.584 ± 605	811 ± 60	85
1 x 10 ⁻³	6.408 ± 1179	1.085 ± 183	83
1 x 10 ⁻²	4.143 ± 280	1.901 ± 137	54
1 x 10 ⁻¹	1.241 ± 128	1.207 ± 114	3
1	1.204 ± 94	1.517 ± 250	0

Legende:

- 1) Hydroxyurea-Konzentration in Mol/ml Lymphozyten-Kultur;
- 2) nicht-dialysiertes Medium unstimulierter Lymphozyten-Kulturen;
- 3) nicht-dialysiertes Medium stimulierter Lymphozyten-Kulturen;
- 4) Lymphotoxin-Aktivität angegeben in %-Hemmung der Indikatorzell-DNS-Synthese, berechnet aus der Abnahme der cpm in den Kulturen mit Lymphotoxin-Medium bezogen auf die cpm in den Kulturen mit Kontrollmedium;
- 5) cpm 3H-Thymidin-Aufnahme/Indikatorzell-Kultur nach Inkubation mit den Lymphozyten-Medien: Mittelwerte von Dreifachbestimmungen ± Standardabweichung.

Tab. 4.2.2.3:

Die Wirkung von Hydroxyurea auf die PHA-induzierte Lymphoproliferation

<u>Hydroxyurea</u>	<u>Lymphoproliferation</u>	
M ¹⁾	cpm 3H-Thymidin-Einbau	%-Hemmung
0	20.222 ± 1871 ²⁾ (71) ³⁾	0 ⁴⁾
1 x 10 ⁻⁶	20.908 ± 6129 (105)	0
1 x 10 ⁻⁵	26.506 ± 2599 (102)	0
1 x 10 ⁻⁴	21.034 ± 2412 (78)	0
1 x 10 ⁻³	24.716 ± 3416 (95)	0
1 x 10 ⁻²	4.646 ± 1273 (43)	77
1 x 10 ⁻¹	475 ± 103 (56)	98
1	30 ± 4 (41)	100

Legende:

- 1) Hydroxyurea-Konzentration in Mol/ml Lymphozyten-Kultur;
- 2) Lymphoproliferation angegeben als Mittelwert von Dreifachbestimmungen ± Standardabweichung der cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Lymphozyten-Kulturen nach Stimulation mit 50 µg PHA pro Kultur;
- 3) cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in nicht-stimulierte Lymphozyten-Kulturen (spontane Lymphoproliferation);
- 4) %-Hemmung der Lymphoproliferation berechnet aus der Abnahme der cpm 3H-Thymidin-Aufnahme bezogen auf die Kontrollkultur (ohne Hydroxyurea).

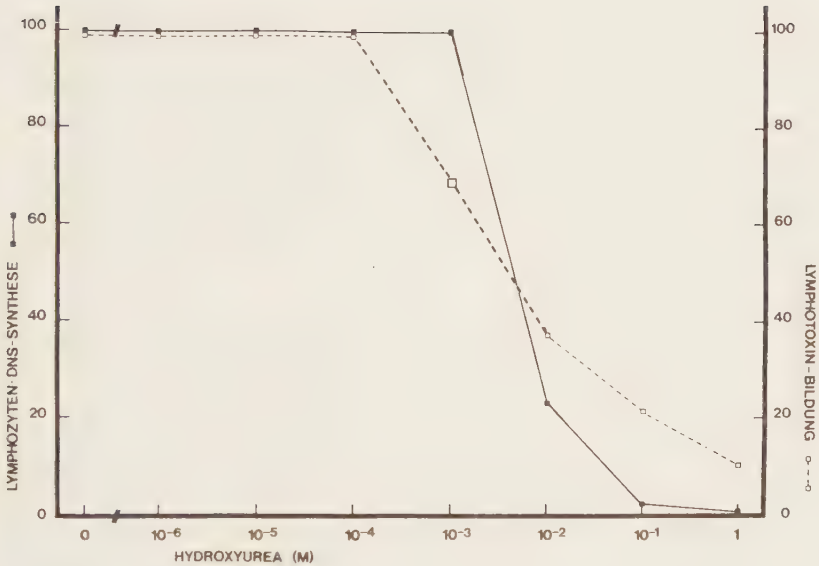


Abb. 4.2.2.: Die Wirkung von Hydroxyurea auf die Lymphotoxin-Bildung und PHA-induzierte Lymphoproliferation (DNS-Synthese)

Abszisse: Hydroxyurea-Konzentration in Mol/ml Lymphozyten-Kultur.

Ordinate links und durchgezogene Kurve: Lymphozyten-DNS-Synthese angegeben in %-³H-Thymidin-Aufnahme in Lymphozyten-Kulturen.

Ordinate rechts und gestrichelte Kurve: Lymphotoxin-Bildung angegeben in Einheiten gemessen im DNS-Synthese-Hemmtest (s. Kap. 3.8).

Jeder Punkt gibt den Mittelwert von Dreifachbestimmungen an.

4.2.3 Die Wirkung von Hydroxyurea auf die Kinetik der Lymphotoxin-Bildung (Kinetikstudie)

Mitogen-stimulierten Lymphozyten-Kulturen (Exp. A: 50 µg PHA/Kultur bzw. Exp. B: 62 µg Con A/Kultur) wurde zu verschiedenen Zeiten nach Stimulationsbeginn zellfreies Medium entnommen und dessen Lymphotoxin-Aktivität bestimmt (Lymphotoxin-Kinetik ohne Hemmstoff). In Parallelkulturen, die gleichzeitig mit dem Mitogen 0,02 M Hydroxyurea erhalten hatten, wurde zu denselben Zeiten ebenso der Lymphotoxin-Gehalt ermittelt (Lymphotoxin-Kinetik mit Hydroxyurea). Die Lymphoproliferation wurde in beiden Ansätzen nach 3 Tagen bestimmt.

Bereits 5 bzw. 7 Stunden nach Stimulationsbeginn ist Lymphotoxin-Aktivität im zellfreien Medium nachzuweisen. Der Lymphotoxin-Gehalt steigt weiter stetig an, um dann nach 60 (Exp. A) bzw. 48 Stunden (Exp. B) sein Maximum zu erreichen. In Exp. A zeigt die Kurve der Lymphotoxin-Kinetik einen typisch "biphasischen" Verlauf: der erste Gipfel soll dem "frühen", der zweite dem "späten" Lymphotoxin entsprechen (Abb. 4.2.3.1).

Hydroxyurea zeigt in beiden Versuchen auf den Anstieg der Lymphotoxin-Aktivität während der ersten 29 bzw. 32 Stunden keinen Einfluß. Danach nimmt der Lymphotoxin-Gehalt der Medien nicht weiter zu und erreicht nur maximal 50 % der Lymphotoxin-Aktivität der Kontroll-Kultur (ohne Hydroxyurea) (Abb. 4.2.3.1, Abb. 4.2.3.2, Tab. 4.2.3.1 und Tab. 4.2.3.3).

In beiden Experimenten ist nach 72 Stunden die Mitogen-induzierte Lymphoproliferation durch 0,02 M Hydroxyurea völlig blockiert (Tab. 4.2.3.2 und Tab. 4.2.3.4).

Zusammenfassend können wir sagen, daß Hydroxyurea die Replikation und damit die Lymphoproliferation hemmt. Bei gleichbleibender Zellzahl bleibt die Menge des gebildeten Lymphotoxins ab der 30. Stunde konstant (siehe Lymphotoxin-Kinetik mit Hydroxyurea in Abb. 4.2.3.1 und Abb. 4.2.3.2). In der Kultur ohne den Hemmstoff findet dagegen eine ungehemmte Zellproliferation statt. Mehr Zellen bilden mehr Lymphotoxin. Dies zeigt sich ab der 30. Stunde in einer weiteren Zunahme der Lymphotoxin-Aktivität (siehe

Tab. 4.2.3.1: Wirkung von Hydroxyurea auf die Kinetik der Lymphotoxin-Bildung (Experiment A)

Inkubations-zeit	Lymphotoxin-Bildung ohne Hydroxyurea	Lymphotoxin-Bildung mit Hydroxyurea
0 Std.	0	0
5 Std.	19 (18- 20)	0
12 Std.	29 (23- 39)	27 (23-31)
18 Std.	46 (37- 66)	46 (43-51)
24 Std.	50 (49- 56)	41 (41-49)
30 Std.	37 (36- 39)	39 (39-47)
36 Std.	66 (63- 84)	50 (48-65)
42 Std.	66 (66- 79)	25 (23-30)
48 Std.	84 (77-107)	39 (38-49)
60 Std.	104 (103-123)	45 (44-56)
69 Std.	100 (77-109)	45 (41-56)

Lymphotoxin-Bildung angegeben in Einheiten (siehe Kap. 3.8); Hydroxyurea (0,02 M) wurde gleichzeitig mit PHA den Kulturen zugegeben und während der angegebenen Inkubationsdauer auf den Zellen belassen.

Tab. 4.2.3.2: Wirkung von Hydroxyurea auf die Lymphoproliferation

Hydroxyurea M	Lymphoproliferation	
	cpm 3H-Thymidin-Einbau	%-Hemmung
0	18.381 (436)	0
0.02	137 (589)	99

Lymphoproliferation angegeben in cpm 3H-Thymidin-Aufnahme nach Stimulation mit 50 µg PHA pro Kultur; in Klammern: cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in nicht-stimulierten Lymphozyten-Kulturen (spontane Lymphoproliferation).

Hydroxyurea wurde gleichzeitig mit PHA den Kulturen zugegeben und während der 3-tägigen Inkubation auf den Lymphozyten belassen.

Tab. 4.2.3.3: Wirkung von Hydroxyurea auf die Kinetik der Lymphotoxin-Bildung (Experiment B)

Inkubations- zeit	Lymphotoxin-Bildung ohne Hydroxyurea	Lymphotoxin-Bildung mit Hydroxyurea
0 Std.	0	0
7 Std.	6 (6- 7)	4 (3- 5)
16 Std.	20 (13-29)	16 (14-17)
18 Std.	27 (19-33)	18 (15-20)
24 Std.	40 (33-47)	22 (13-34)
32 Std.	57 (53-57)	42 (35-45)
42 Std.	87 (81-87)	35 (29-37)
48 Std.	100 (99-102)	23 (22-24)
56 Std.	100 (81-100)	13 (12-14)
69 Std.	100 (100-107)	42 (35-45)

Lymphotoxin-Bildung angegeben in Einheiten (siehe Kap. 3.8); Hydroxyurea (0,02 M) wurde gleichzeitig mit Con A den Kulturen zugegeben und während der angegebenen Zeit auf den Lymphozyten belassen.

Tab. 4.2.3.4: Wirkung von Hydroxyurea auf die Lymphoproliferation

Hydroxyurea M	Lymphoproliferation	
	cpm 3H-Thymidin-Einbau	%-Hemmung
0	145.474 (2.679)	0
0.02	791 (2.578)	99

Lymphoproliferation angegeben in cpm 3H-Thymidin-Aufnahme nach Stimulation mit 62 µg Con A pro Kultur; in Klammern: cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in nicht-stimulierten Lymphozyten-Kulturen (spontane Lymphoproliferation).

Hydroxyurea wurde gleichzeitig mit Con A den Kulturen zugegeben und während der 3-tägigen Inkubation auf den Lymphozyten belassen.

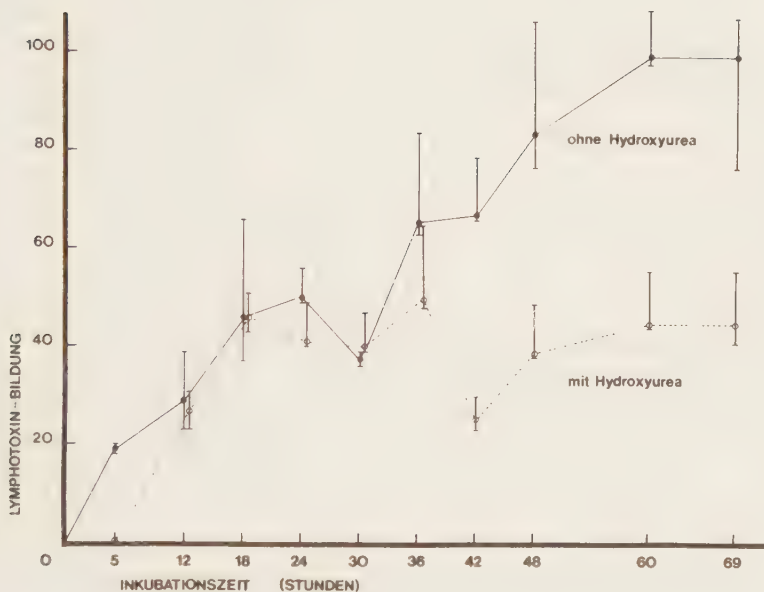


Abb. 4.2.3.1: Wirkung von Hydroxyurea auf die Kinetik der Lymphotoxin-Bildung (Exp. A)

Abszisse: PHA-Inkubation (durchgezogene Kurve) bzw. PHA- und Hydroxyurea-Inkubation (gestrichelte Kurve) in Stunden

Ordinate: Lymphotoxin-Aktivität in Einheiten (s. Kap. 3.8); die Kontrollkultur (ohne Hydroxyurea) enthielt nach 69 Stunden absolut 56 Einheiten.
 durchgezogene Kurve: Kinetik der Lymphotoxin-Bildung ohne Hemmstoff: Ernte der Überstände zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten.
 gestrichelte Kurve: Kinetik der Lymphotoxin-Bildung in Anwesenheit von 0.02 M Hydroxyurea: Ernte der Überstände zu den angegebenen Zeiten.

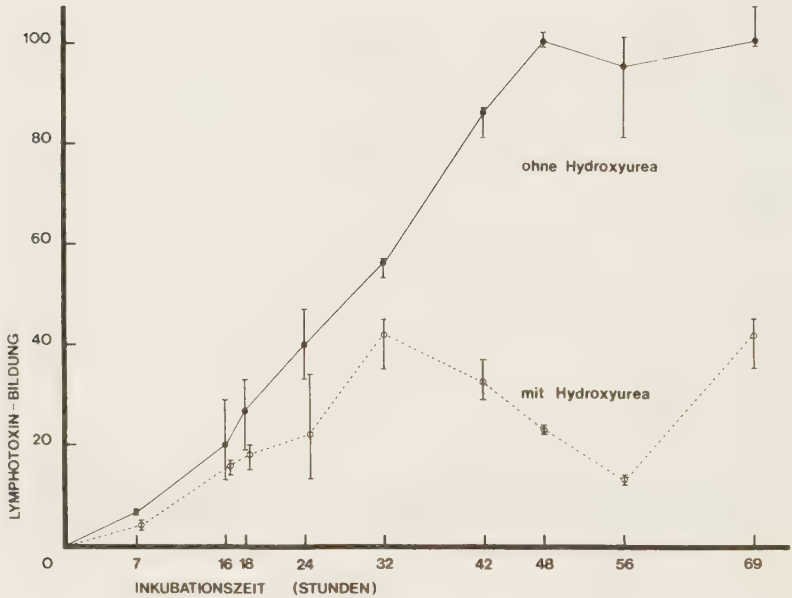


Abb. 4.2.3.2: Wirkung von Hydroxyurea auf die Kinetik der Lymphotoxin-Bildung (Exp. B)

Abszisse: Con A-Inkubation (durchgezogene Kurve) bzw. Con A- und Hydroxyurea-Inkubation (gestrichelte Kurve) in Stunden.

Ordinate: Lymphotoxin-Aktivität in Einheiten (s. Kap. 3.8); die Kontrollkultur (ohne Hydroxyurea) enthielt nach 69 Stunden absolut 174 Einheiten.
durchgezogene Kurve: Kinetik der Lymphotoxin-Bildung ohne Hemmstoff: Ernte der Überstände zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten.
gestrichelte Kurve: Kinetik der Lymphotoxin-Bildung in Anwesenheit von 0.02 M Hydroxyurea: Ernte der Überstände zu den angegebenen Zeiten.

Lymphotoxin-Kinetik ohne Hydroxyurea in Abb. 4.2.3.1 und Abb. 4.2.3.2). Die Lymphotoxin-Bildung bis zur 30. Stunde scheint von einer Proliferation der Lymphozyten unabhängig zu sein. Beide Kulturen - d.h. mit und ohne den Hemmstoff - zeigen bis zu diesem Zeitpunkt eine identische Lymphotoxin-Aktivität.

4.2.4 Die Interferenz von Lymphotoxin und Hydroxyurea im DNS-Synthese-Hemmtest

Die Medien stimulierter Lymphozyten-Kulturen, die mit Hydroxyurea inkubiert wurden, enthalten außer Lymphotoxin auch noch eine unbekannte Menge des Inhibitors. Ein hemmender Effekt von Hydroxyurea auf die DNS-Synthese der HeLa-Zellen ist bekannt. Im Folgenden haben wir untersucht, wie sich die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Lymphotoxin und Hydroxyurea auf die DNS-Synthese auswirkt.

HeLa-Zell-Kulturen wurden mit konstanten Lymphotoxin-Mengen und steigenden Hydroxyurea-Konzentrationen 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die DNS-Synthese der Zellen bestimmt.

Hydroxyurea hemmt ab einer Konzentration von $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ die DNS-Synthese der HeLa-Zellen. In niedrigen Dosen beeinflusst es die DNS-Synthese nicht und interferiert auch nicht mit der Wirkung von Lymphotoxin auf die HeLa-Zellen. Die Lymphotoxin-haltigen Medien zeigen zusammen mit diesen Hydroxyurea-Konzentrationen denselben Hemmeffekt wie ohne den Inhibitor. Zusammen mit $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ Hydroxyurea vermindert sich die hemmende Wirkung von Lymphotoxin um 20 - 40 %. Höhere Konzentrationen des Inhibitors blockieren die DNS-Synthese völlig, sodaß die Lymphotoxin-Aktivität nicht mehr meßbar ist (Tab. 4.2.4).

Eine Dialyse aller Hydroxyurea-haltigen zellfreien Kulturmedien ist somit vor deren Austestung im DNS-Synthese-Hemmtest notwendig.

Tab. 4.2.4: Interferenz von Lymphotoxin und Hydroxyurea im DNS-Synthese-Hemmtest

Hydroxyurea M ¹⁾	Lymphotoxin-Aktivität		
	0 Einheiten	10 Einheiten	50 Einheiten
0	11.937 ²⁾	3.645 (-69%) ³⁾	2.045 (-83%)
5 x 10 ⁻⁸	11.729	3.534 (-70%)	2.155 (-82%)
5 x 10 ⁻⁷	12.760	4.010 (-69%)	2.443 (-81%)
5 x 10 ⁻⁶	15.284	3.504 (-77%)	2.348 (-85%)
5 x 10 ⁻⁵	16.485	5.063 (-69%)	4.171 (-75%)
5 x 10 ⁻⁴	3.568	1.985 (-44%)	1.954 (-45%)
5 x 10 ⁻³	524	506	344
5 x 10 ⁻²	273	186	128
			303
			136

Legende:

- 1) Hydroxyurea-Konzentration in Mol/ml Indikatorzell-Kultur;
- 2) cpm ³H-Thymidin-Aufnahme/Indikatorzell-Kultur: Mittelwerte von Dreifachbestimmungen; Abweichungen der Einzelwerte vom Mittelwert lagen in jedem Ansatz unter 15%;
- 3) Hemmung der DNS-Synthese in %, bezogen auf die jeweilige Kontroll-Kultur (0 Einheiten Lymphotoxin).

4.3 Actinomycin D

4.3.1 Die Wirkung von Actinomycin D auf Lymphozyten

Nach LIEBERMANN et al. (76) lassen sich mit Actinomycin D, einem irreversiblen Hemmstoff der DNS-abhängigen RNS-Synthese, in einer Konzentration von 1 µg/ml der Einbau radioaktiver Vorstufen in die DNS von Lymphozyten um 40 %, in die RNS um 97 % und in Protein um 93 % hemmen. In einer anderen Arbeit wird die RNS-Synthese stimulierter Lymphozyten mit 1 µg Actinomycin D/ml nach einer Stunde um 80 % gehemmt (127).

In einer vorangegangenen Dosiswirkungsstudie (2a) fanden wir unter unseren Versuchsbedingungen mit 6 µg Actinomycin D/ml eine Hemmung der PHA-induzierten Lymphoproliferation um 99 % und der Lymphotoxin-Bildung um 58 %.

Mit dieser Actinomycin D-Dosis soll im folgenden die Abhängigkeit der Lymphotoxin-Bildung von der RNS-Synthese untersucht werden. Durch Zugabe von Actinomycin D zu verschiedenen Zeiten, d.h. vor, gleichzeitig mit und nach Stimulation, soll geklärt werden, ob Lymphotoxin a) an einer bereits vorgefertigten mRNS synthetisiert wird oder b) zur Lymphotoxin-Bildung eine Transskription nötig ist.

4.3.2 Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation nach Vorinkubation mit Actinomycin D

Lymphozyten wurden für 1/2, 1 und 2 Stunden mit Actinomycin D (10 µg/ml Kultur) vorinkubiert, gewaschen und dann mit PHA (50 µg/ml Kultur) stimuliert. Nach 16, 25, 45 und 120 Stunden wurde die Lymphotoxin-Aktivität der zellfreien Medien bestimmt. Das Lysat der 16, 25 und 120 Stunden PHA-stimulierten Zellen (Pellet) wurde ebenfalls auf seinen Lymphotoxin-Gehalt untersucht. Die PHA-induzierte Lymphoproliferation wurde nach 45 Stunden bestimmt. Kontrollkulturen wurden nicht mit dem Hemmstoff, im übrigen aber wie die experimentellen Kulturen behandelt.

Die PHA-induzierte Lymphoproliferation zeigt gegenüber Actinomycin D eine größere Empfindlichkeit als die Lymphotoxin-Bildung. Nach einer 1/2 Stunde Vorinkubation mit Actinomycin D ist bei völlig blockierter Lymphoproliferation (DNS-Synthese) die Lymphotoxin-Bildung erst um die Hälfte vermindert. Eine Vorinkubation mit Actinomycin D für 1 und 2 Stunden reduziert die Lymphotoxin-Bildung auf 7 % bzw. 9 % (Tab. 4.3.2).

Tab. 4.3.2: Wirkung von Actinomycin D auf Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation

Actinomycin D	Lymphoproliferation	Lymphotoxin-Bildung
0	30.138 (296)	100
10 µg/ml: 1/2 Std.	115 (84)	47
10 µg/ml: 1 Std.	91 (80)	9
10 µg/ml: 2 Std.	59 (147)	7

Legende:

Lymphoproliferation angegeben in cpm 3H-Thymidin-Aufnahme pro Kultur nach Stimulation mit PHA.

In Klammern: cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in nicht-stimulierten Kulturen.

Lymphotoxin-Bildung angegeben in Einheiten (siehe Kap. 3.8). Die Kontrollkultur (ohne Actinomycin D) in diesem Versuch enthielt absolut 72 Einheiten.

Alle Werte wurden nach 45 Stunden PHA-Inkubationszeit ermittelt.

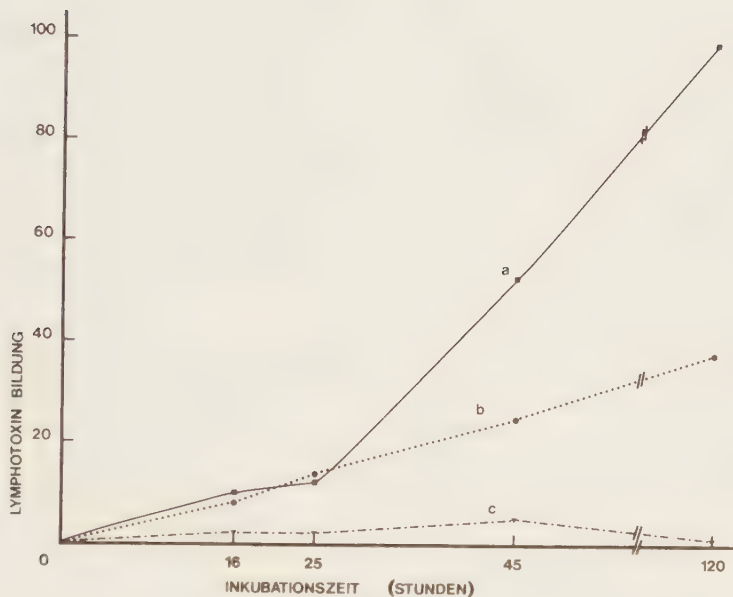


Abb. 4.3.2.1: Kinetik der Lymphotoxin-Bildung nach Vorinkubation mit Actinomycin D: A) Bestimmung der Lymphotoxin-Aktivität im zellfreien Medium.

Abszisse: PHA-Inkubationszeit in Stunden.

Ordinate: Lymphotoxin-Aktivität angegeben in Einheiten (s. Kap. 3.8); die Kontrollkultur (ohne Actinomycin) enthielt nach 120 Stunden absolut 136 Einheiten.

- a) Lymphotoxin-Bildung der Kontrollkultur (ohne Actinomycin D);
- b) Lymphotoxin-Bildung nach 1/2-stündiger Vorinkubation mit Actinomycin D;
- c) Lymphotoxin-Bildung nach 1-bzw. 2-stündiger Vorinkubation mit Actinomycin D. Beide Ansätze ergaben identische Werte.

Jeder Punkt gibt den Mittelwert von Dreifachbestimmungen an.

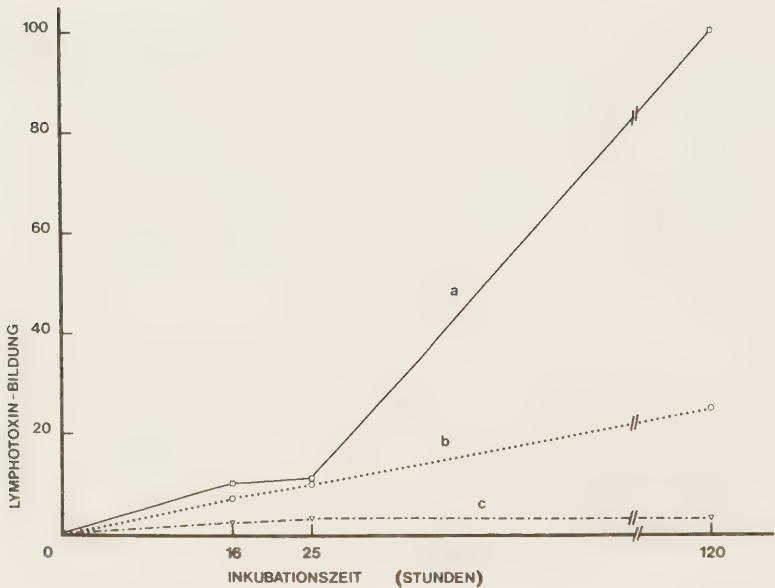


Abb. 4.3.2.2.: Kinetik der Lymphotoxin-Bildung nach Vorinkubation mit Actinomycin D: B) Bestimmung der Lymphotoxin-Aktivität im Lysat.

Abszisse: PHA-Inkubation in Stunden.

Ordinate: Lymphotoxin-Aktivität angegeben in Einheiten (s. Kap. 3.8); die Kontrollkultur (ohne Actinomycin D) enthielt nach 120 Stunden absolut 136 Einheiten.

- a) Lymphotoxin-Bildung der Kontrollkultur (ohne Actinomycin D);
- b) Lymphotoxin-Bildung nach 1/2-stündiger Vorinkubation mit Actinomycin D;
- c) Lymphotoxin-Bildung nach 1- bzw. 2-stündiger Vorinkubation mit Actinomycin D. Beide Ansätze ergaben identische Werte.

Jeder Punkt gibt den Mittelwert von Dreifachbestimmungen an.

Medien von einer für eine 1/2 Std. mit Actinomycin D (10 µg/ml) vorinkubierten Lymphozyten-Kulturen zeigen nach 16 und 25 Stunden PHA-Stimulation eine gegenüber der Kontrollkultur unveränderte Lymphotoxin-Aktivität. Nach 45 und 120 Stunden Stimulation ist die Lymphotoxin-Aktivität verringert; der zweite steilere Anstieg der Kurve (vgl. Kontrollkurve a, nicht vorinkubiert) bleibt aus. Die initiale Lymphotoxin-Bildung (bis 25 Stunden) bleibt unbeeinflusst. Nach ein- und zweistündiger Vorinkubation mit Actinomycin D wird sowohl die Bildung des "frühen", d.h. vor der 25. Stunde gebildeten, als auch des "späten" Lymphotoxins zu 95-100 % gehemmt (Abb. 4.3.2.1).

Das Lysat zeigt im wesentlichen dieselbe Lymphotoxin-Aktivität wie das zellfreie Medium: Nach 1 und 2 Stunden Actinomycin D-Vorinkubation ist die Lymphotoxin-Bildung zu allen Zeiten (16, 25 und 120 Stunden) um 97-98 % gehemmt. 1/2-stündige Vorinkubation läßt die Lymphotoxin-Bildung der ersten 25 Stunden unbeeinflusst, nach 120 Stunden vermindert sie sich auf 25 % (Abb. 4.3.2.2).

Da nach 1 und 2 Stunden Vorinkubation mit Actinomycin D keine Lymphotoxin-Bildung durch PHA induzierbar ist, muß man annehmen, daß ruhende Lymphozyten keinen mRNS-Pool für Lymphotoxin haben. Die reduzierte Lymphotoxin-Bildung von mit dem Inhibitor während einer 1/2 Stunde vorbehandelten Lymphozyten ist am ehesten durch eine unvollständige Sättigung der DNS mit Actinomycin D zu erklären.

4.3.3 Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation nach gleichzeitiger Zugabe von Actinomycin D und Mitogen

PHA-stimulierten (50 µg/Kultur) Lymphozyten wurde gleichzeitig mit dem Mitogen 0,6 µg Actinomycin D/ml zugegeben und für 0, 1, 2, 4, 5 und 6 Stunden auf den Kulturen belassen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in frischem Kulturmedium resuspendiert und nochmals mit PHA stimuliert. Kontrollkulturen erhielten kein Actinomycin D. Nach 3-tägiger Inkubation wurde die Lymphotoxin-Aktivität der zellfreien Medien und die Lymphoproliferation bestimmt.

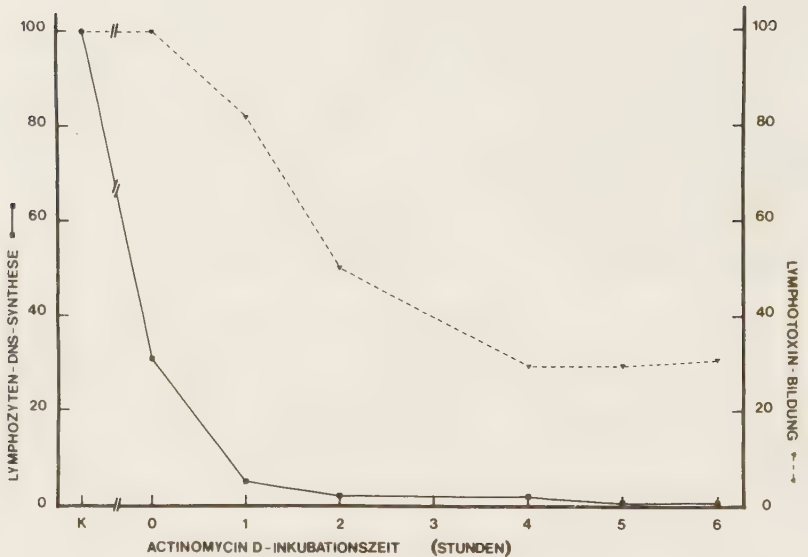


Abb. 4.3.3: Lymphotoxin-Bildung und Lymphozyten-Proliferation nach Inkubation mit Actinomycin D für 0-6 Stunden

Abszisse: Inkubationszeit mit Actinomycin D in Stunden

Ordinate links: (gestrichelte Kurve) Lymphotoxin-Aktivität angegeben in Einheiten (s. Kap. 3.8); die Kontrollkultur (ohne Actinomycin D) enthielt absolut 241 Einheiten. Die Kurve repräsentiert den Mittelwert von zwei Austestungen.

Ordinate rechts: (durchgezogene Kurve) Lymphozyten-Proliferation angegeben in %-³H-Thymidin-Aufnahme pro Lymphozyten-Kultur bezogen auf die Kontrollkultur K (Kultur ohne Actinomycin D).

Jeder Punkt gibt den Mittelwert von Dreifachbestimmungen an.

Bereits nach kurzzeitigem Kontakt (Zugabe und sofortiges Auswaschen, "0" Stunden) mit Actinomycin D wird die Lymphoproliferation auf 31 % des Kontrollwertes reduziert; ein Einfluß auf die Lymphotoxin-Bildung ist hierbei nicht nachweisbar. Hier liegt offensichtlich eine reine Hemmung der Replikation vor. Nach 1 Stunde Actinomycin D-Inkubation ist die Lymphoproliferation völlig blockiert; die Lymphotoxin-Bildung wird auf 84 % reduziert. 2 Stunden Inkubation bewirken einen Abfall der Lymphotoxin-Synthese auf 49 %, 4 bis 6 Stunden verringern sie auf 30 % (Abb. 4.3.3).

0,6 µg Actinomycin D/ml hemmen die Lymphoproliferation komplett, die Lymphotoxin-Bildung jedoch auch nach 6-stündiger Einwirkungszeit nur maximal um 70 %. Auch unter Berücksichtigung einer RNS-Bildung bis zum Wirkungseintritt von Actinomycin D, sind, unter der Voraussetzung, daß 0,6 µg Actinomycin D die RNS-Synthese völlig blockieren, die restlichen 30 % Lymphotoxin außer durch eine RNS-Neusynthese-unabhängige Lymphotoxin-Bildung schwer zu erklären. Dieses Ergebnis widerspricht jedoch dem Ergebnis von Versuch 4.3.2.

4.3.4 Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation nach Zugabe von Actinomycin D während der frühen Phase der PHA-Stimulation.

Wir untersuchten den Einfluß der RNS-Synthese-Hemmung auf Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation während der frühen Phase nach Mitogen-Stimulation.

Hierzu wurden Lymphozyten-Kulturen 1,2,3,4,5,6 und 7 Stunden nach PHA-Stimulation (50 µg/Kultur) für jeweils 6 Stunden mit Actinomycin D (0,6 µg/ml) inkubiert, anschließend gewaschen, in frischem Kulturmedium resuspendiert und nochmals mit PHA stimuliert. Kontrollkulturen erhielten keinen Hemmstoff, wurden aber ansonsten einschließlich der Waschprozedur gleich behandelt. 72 Stunden nach der zweiten Stimulation wurden die Lymphotoxin-Aktivität der zellfreien Medien und die Lymphoproliferation bestimmt.

Tab. 4.3.4: Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation nach Zugabe von Actinomycin D in der frühen Phase der PHA-Stimulation

<u>Versuchsprotokoll:</u>					<u>Ergebnisse:</u>	
0-----1 (2-7)-----7 (8-13) 0-----//-----72 Stunden		1. Stimulation	Zugabe	2. Stimulation	Lymphotoxin-Bildung	Lymphoproliferation
Experiment mit	PHA	Act.D	Waschen/PHA		0-4	0
Actinomycin D	-	Act.D	Waschen/ -		0	0
Kontrolle ohne	PHA	-	Waschen/PHA		55-100 *)	78-100 *)
Actinomycin D	-	-	Waschen/ -		0	0

Legende:

Lymphoproliferation angegeben in % der cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in der zweimal PHA-stimulierten Lymphozyten-Kultur (ohne Actinomycin D) diente als Kontrolle.

Lymphotoxin-Aktivität angegeben in Einheiten (siehe Kap. 3.8); die Kontroll-Kultur (ohne Actinomycin D) enthielt in diesem Versuch absolut 93 Einheiten.

*) Bei den Ergebnissen wurde jeweils deren Spannbreite angegeben: So erreichte die Lymphoproliferation in einer Kultur, die nach 7 Stunden gewaschen und restimuliert wurde, 100 %, jedoch in einer Kultur, die erst nach 13 Stunden gewaschen und restimuliert wurde, nur 78 %. Die Lymphotoxin-Aktivität wurde in einer Kultur, die nach 7 Stunden gewaschen und restimuliert wurde, mit 100 relativen Lymphotoxin-Einheiten ermittelt; die Kultur, die nach 13 Stunden der gleichen Prozedur unterworfen wurde, bildete nur noch 55 Lymphotoxin-Einheiten.

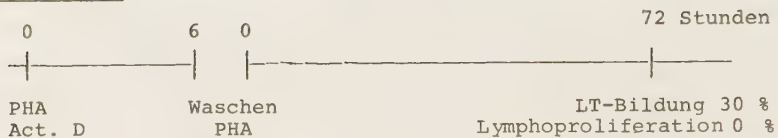
Kontrollkulturen (ohne Actinomycin D), die nach 7 Stunden gewaschen und restimuliert wurden, zeigen nach weiteren 72 Stunden 100 %-ige Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation. In nach 10 Stunden gewaschenen und restimulierten Kontrollkulturen ist die Lymphotoxin-Bildung auf 97 %, die Lymphoproliferation auf 95 % geringfügig vermindert. Werden dagegen die Kulturen nach 13 Stunden gewaschen und erneut mit PHA stimuliert, so sind nach weiteren 3 Tagen nur noch 55 % der ursprünglichen Lymphotoxin-Aktivität und 78 % der DNS-Synthese nachzuweisen (Tab. 4.3.4).

Der Abfall der Lymphotoxin-Aktivität ist nur damit zu erklären, daß durch die Waschprozedur bis dahin gebildetes Lymphotoxin verloren geht und die Zelle nicht mehr die Fähigkeit hat, diesen Verlust auszugleichen. Die Verringerung der Lymphoproliferation (DNS-Synthese) steht in Einklang mit Untersuchungen von EIFE et al. (18), die zeigen, daß Re-Stimulation der Lymphozyten zu einer etwa 50 % Verminderung der Lymphoproliferation führen kann.

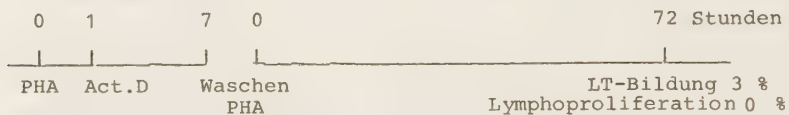
Die Bestimmung der Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation 72 Stunden nach zweiter PHA-Stimulation zeigt uns, daß unabhängig vom Zeitpunkt der Zugabe 6 Stunden Actinomycin D während der frühen Phase der Mitogen-Stimulation ausreichen, um jegliche Lymphotoxin-Bildung und DNS-Synthese zu hemmen.

Die Kultur, die 1 Stunde nach Stimulationsbeginn für 6 Stunden Actinomycin D erhält, zeigt im Gegensatz zu einer Kultur, die gleichzeitig mit dem Mitogen für 6 Stunden Actinomycin D bekommt (Kap. 4.3.3), nach Restimulation keine Lymphotoxin-Bildung. Diese verschiedenen Ergebnisse der beiden Experimente 4.3.3 und 4.3.4 könnten eventuell dadurch erklärt werden, daß nach einer Stunde Inkubation mit PHA die Lymphozyten-DNS für Actinomycin D empfindlicher wird. Da es jedoch zwei unabhängige Experimente sind, kann es sich auch um eine Schwankung des Tests handeln.

Kap. 4.3.3:



Kap. 4.3.4:



Bei der Kultur, die nach 7 Stunden Stimulation Actinomycin D erhält und nach 13 Stunden gewaschen und restimuliert wird, müssen wir berücksichtigen, daß zuvor gebildetes Lymphotoxin durch die Waschprozedur höchstwahrscheinlich verloren ging (vgl. Tab. 4.3.4).

Für eine eindeutige Beurteilung dieses Versuches fehlt die zusätzliche Bestimmung der Lymphotoxin-Aktivität jeweils nach Ende der Actinomycin D-Inkubation. Dieses Experiment kann somit nur bedingt in der Diskussion über die Abhängigkeit der Lymphotoxin-Bildung von der RNS-Synthese berücksichtigt werden.

4.3.5 Lymphotoxin-Kinetik und Hemmung der Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation durch Actinomycin D (Kinetikstudie)

Mit diesem Ansatz soll die Synthese-Kinetik der für Lymphotoxin zuständigen mRNS bestimmt werden.

In zellfreien Medien PHA-stimulierter Lymphozyten-Kulturen wurde zu verschiedenen Zeiten nach Stimulationsbeginn die Lymphotoxin-Aktivität bestimmt (Lymphotoxin-Kinetik).

Ebenfalls stimulierten Parallelkulturen wurde exakt zu den "Erntezeiten" der Kinetik-Studie 0,9 µg Actinomycin D/ml zugegeben. Die Inkubation wurde fortgesetzt und nach insgesamt 3 Tagen die Lymphotoxin-Aktivität der zellfreien Medien bestimmt (Actinomycin-Hemmstudie). Die Lymphoproliferation wurde in beiden Ansätzen (Lymphotoxin-Kinetik und Actinomycin-Hemmstudie) nur einmal nach 72 Stunden ermittelt.

Die Wirkung von Actinomycin D auf die Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation in Abhängigkeit vom Zeitpunkt seiner Zugabe nach PHA-Stimulation

Zugabe von Actinomycin D (0,9 µg/ml) bis zur 36. Stunde nach Stimulationsbeginn hemmt völlig die Lymphoproliferation. Zu einem späteren Zeitpunkt (48.-72. Stunde) läßt es eine Lymphozyten-DNS-Synthese von maximal 1-9 % der Kontrollkultur (ohne Actinomycin D) zu. Die nach 72 Stunden gemessene Lymphotoxin-Aktivität der zellfreien Medien ist umso niedriger, je früher die Kultur Actinomycin D erhielt. Eine kurzzeitige Inkubation mit Actinomycin D (Zugabe zur 72. Stunde) beeinflußt den Lymphotoxin-Gehalt des Überstandes nicht mehr (Tab. 4.3.5).

Kinetik der Lymphotoxin-Bildung und Kinetik der mRNS-Synthese

Nach PHA-Stimulation steigt die Lymphotoxin-Aktivität in der Kultur während der ersten 30 Stunden allmählich, danach steil an. Die größte Lymphotoxin-Aktivität wird nach 72 Stunden erreicht. In diesem Versuch ist der Lymphotoxin-Gehalt während der ersten 24 Stunden besonders niedrig.

Durch Zugabe von Actinomycin D zu verschiedenen Zeiten nach PHA-Stimulation soll die mRNS-Neusynthese gehemmt werden. Die nach Zugabe von Actinomycin D bestimmte Lymphotoxin-Aktivität entspricht bis auf maximal + 10 % dem Lymphotoxin-Gehalt der jeweiligen Kontrollkultur. Berücksichtigt man die Zeit bis zum Wirkungseintritt von Actinomycin D, so zeigt sich, daß der Inhibitor die RNS-synthese und damit jede weitere Lymphotoxin-Bildung hemmt. Für die Lymphotoxin-Bildung ist somit eine RNS-Synthese notwendig (Abb. 4.3.5).

Tab. 4.3.5:

Wirkung von Actinomycin D auf Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation in Abhängigkeit vom Zeitpunkt seiner Zugabe nach Stimulationsbeginn

Actinomycin D Zugabe-Zeitpunkt	Lymphoproliferation	Lymphotoxin-Bildung
keine Zugabe	39.033 (24)	100
0. Std.	153	0
12. Std.	53	n.t. +)
24. Std.	39	3
30. Std.	110	17
36. Std.	119	20
48. Std.	275	43
54. Std.	255	76
60. Std.	587	88
72. Std.	3.453 (41)	100

Legende:

Lymphoproliferation angegeben in cpm ³H-Thymidin-Aufnahme in Lymphozyten-Kulturen nach Stimulation mit 50 µg PHA.
In Klammern: cpm ³H-Thymidin-Aufnahme in nicht-stimulierte Kulturen.

Lymphotoxin-Bildung angegeben in Einheiten (siehe Kap. 3.8.); die Kontroll-Kultur (ohne Actinomycin D) enthielt in diesem Versuch absolut 140 Einheiten.

Außer der Kontroll-Kultur (Zeile 1) erhielt jede Kultur zu den angegebenen Zeiten 0,9 µg Actinomycin D pro ml Kulturvolumen.

Alle Werte wurden nach 3-tägiger PHA-Inkubation ermittelt.

+) nicht getestet (technischer Fehler).

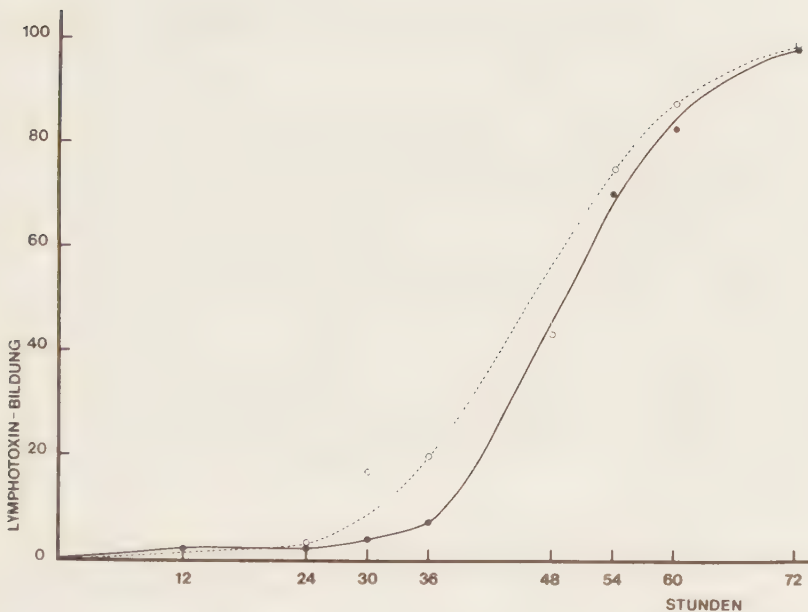


Abb. 4.3.5: Kinetik der Lymphotoxin-Bildung und Hemmung der Lymphotoxin-Bildung nach Zugabe von Actinomycin D

Abszisse: PHA-Inkubation in Stunden (durchgezogene Kurve) bzw. Zeitpunkt der Zugabe von Actinomycin D (gestrichelte Kurve).

Ordinate: Lymphotoxin-Aktivität in Einheiten (s. Kap. 3.8); die Kontrollkultur (ohne Actinomycin D) enthielt nach 72 Stunden absolut 140 Einheiten.
durchgezogene Kurve: Kinetik der Lymphotoxin-Bildung ohne Hemmstoff: Ernte der Überstände zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten.
gestrichelte Kurve: Lymphotoxin-Bildung nach Zugabe von 0,9 µg Actinomycin D/ml zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten; Ernte der Überstände nach 72 Stunden (Hemmstudie).

Jeder Punkt gibt den Mittelwert von Dreifachbestimmungen an.

4.4 Cycloheximid

4.4.1 Die Wirkung von Cycloheximid auf die Lymphotoxin-Synthese und Lymphoproliferation

Für Cycloheximid, einem Inhibitor der Protein-Synthese in Eukaryonten, wurde in einer vorbereitenden Dosiswirkungsstudie ein Konzentrationsbereich ermittelt, der unter unseren Versuchsbedingungen zur völligen Blockade der Lymphotoxin-Bildung führte. Mit 0,06 - 0,6 µg Cycloheximid/ml Lymphozyten-Kulturvolumen ließen sich die PHA-induzierte Lymphotoxin-Bildung um 94 - 100 % und die Lymphoproliferation um 100 % hemmen (2a).

Mit den folgenden Experimenten wurde unter Verwendung dieser Cycloheximid-Konzentrationen untersucht, zu welchen Zeiten Peptidneusynthese für die Lymphotoxin-Bildung notwendig ist.

4.4.2 Lymphotoxin-Kinetik und Hemmung der Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation durch Cycloheximid (Kinetik-Studie)

In zellfreien Medien PHA-stimulierter (50 µg PHA/Kultur) Lymphozyten-Kulturen wurde zu verschiedenen Zeiten nach Stimulationsbeginn die Lymphotoxin-Aktivität gemessen (Lymphotoxin-Kinetik). Ebenfalls PHA-stimulierten Parallelkulturen wurde exakt zu den "Erntezeiten" der Kinetik-Studie Cycloheximid (0,9 µg/ml in Exp. A bzw. 1 µg/ml in Exp. B) zugegeben und dann weiter inkubiert. Nach insgesamt 3 Tagen wurde die Lymphotoxin-Aktivität der zellfreien Medien ermittelt (Hemmstudie).

Die Lymphoproliferation wurde in beiden Ansätzen (Kinetikstudie und Hemmstudie) jeweils nur einmal nach 72 Stunden bestimmt.

Die Wirkung von Cycloheximid auf Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation in Abhängigkeit vom Zeitpunkt seiner Zugabe nach PHA-Stimulation

Cycloheximid zum Zeitpunkt der Stimulation (0 Std.) oder kurz danach (5 Std.) zugegeben, blockiert jede weitere Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation. Erfolgt die Zugabe von Cycloheximid zu einer späteren Zeit, wird die DNS-Synthese der Lymphozyten auch nach kürzestem Kontakt mit dem Inhibitor um 70 % gehemmt. Trotz gehemmter DNS-Synthese findet in den Zellen noch Lymphotoxin-Bildung statt. Je später Cycloheximid der Kultur nach Stimulationsbeginn zugegeben wird, desto höher ist die nach 3 Tagen bestimmte Lymphotoxin-Aktivität. Die Kultur, der nach 60 (Exp. A) bzw. 48 (Exp. B) Stunden Cycloheximid zugegeben wurde, enthält bei Austestung genausoviel Lymphotoxin wie die Kontrollkultur (ohne Cycloheximid) (Tab. 4.4.2.1 und Tab. 4.4.2.2).

Kinetik der Lymphotoxin-Bildung und Hemmung der Lymphotoxin-Bildung nach Zugabe von Cycloheximid

Nach Mitogenstimulation steigt die Lymphotoxin-Aktivität im zellfreien Medium stetig an, um nach 3 Tagen ihr Maximum zu erreichen. In Exp. A zeigt die Kurve der Lymphotoxin-Kinetik einen typisch "biphasischen" Verlauf mit einem ersten "Gipfel" bei 24 Stunden, der dem "frühen" Lymphotoxin entsprechen soll, und einem zweiten steileren Kurvenanstieg als Ausdruck für die Synthese des "späten" Lymphotoxins.

Nach Zugabe von Cycloheximid wird die weitere Lymphotoxin-Bildung je nach Experiment mehr oder weniger blockiert. In Experiment A steigt nach Zugabe des Inhibitors der Lymphotoxin-Gehalt jeder Probe noch um 10-15 % an. In Experiment B bleibt der Lymphotoxin-Gehalt auf dem Niveau der in der Lymphotoxin-Kinetik zum Zeitpunkt der Zugabe des Inhibitors bestimmten Aktivität (Abb. 4.4.2.1 und Abb. 4.4.2.2).

Tab. 4.4.2.1:

Wirkung von Cycloheximid auf Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation in Abhängigkeit vom Zeitpunkt seiner Zugabe nach Stimulationsbeginn (Experiment A)

Cycloheximid Zugabe-Zeitpunkt	Lymphoproliferation	Lymphotoxin-Bildung
keine Zugabe	39.033	100
0. Std.	574	0
12. Std.	4.217 (-99%)	11
24. Std.	8.987 (-89%)	21
30. Std.	7.135 (-82%)	49
36. Std.	6.511 (-83%)	57
48. Std.	4.461 (-89%)	74
54. Std.	5.774 (-85%)	64
60. Std.	5.742 (-85%)	90
72. Std.	11.736 (-70%)	100

Legende:

Lymphoproliferation angegeben in cpm ³H-Thymidin-Aufnahme in Lymphozyten nach Stimulation mit 50 µg PHA/Kultur.
In Klammern: %-Hemmung der Lymphoproliferation berechnet aus der Abnahme der cpm ³H-Thymidin-Aufnahme bezogen auf die Kontroll-Kultur (ohne Cycloheximid).

Lymphotoxin-Bildung angegeben in Einheiten (siehe Kap. 3.8); die Kontroll-Kultur (ohne Cycloheximid) enthielt in diesem Versuch absolut 140 Einheiten.

Außer der Kontroll-Kultur (Zeile 1) erhielt jede Kultur zu den angegebenen Zeiten 0,9 µg Cycloheximid/ml Kulturvolumen.

Alle Werte wurden nach 3-tägiger PHA-Inkubation ermittelt.

Tab. 4.4.2.2:

Wirkung von Cycloheximid auf Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation in Abhängigkeit vom Zeitpunkt seiner Zugabe nach Stimulationsbeginn (Experiment B)

Cycloheximid Zugabe-Zeitpunkt	Lymphoproliferation	Lymphotoxin-Bildung
keine Zugabe	18.381	100
0. Std.	38 (-100%)	0
5. Std.	65 (-100%)	0
12. Std.	95 (-100%)	24
18. Std.	53 (-100%)	35
24. Std.	160 (- 99%)	61
30. Std.	261 (- 99%)	72
36. Std.	760 (- 96%)	74
42. Std.	2.089 (- 89%)	85
48. Std.	3.107 (- 83%)	98
60. Std.	5.551 (- 70%)	100
69. Std.	5.701 (- 69%)	100

Legende:

Lymphoproliferation angegeben in cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Lymphozyten-Kulturen nach Stimulation mit 50 µg PHA.
In Klammern: %-Hemmung der Lymphoproliferation berechnet aus der Abnahme der cpm 3H-Thymidin-Aufnahme bezogen auf die Kontrollkultur (ohne Cycloheximid).

Lymphotoxin-Bildung angegeben in Einheiten (siehe Kap. 3.8); die Kontrollkultur (ohne Cycloheximid) enthielt in diesem Versuch absolut 56 Einheiten.

Außer der Kontroll-Kultur (Zeile 1) erhielt jede Kultur zu den angegebenen Zeiten 1 µg Cycloheximid/ml.

Alle Werte wurden nach 3-tägiger PHA-Inkubation ermittelt.

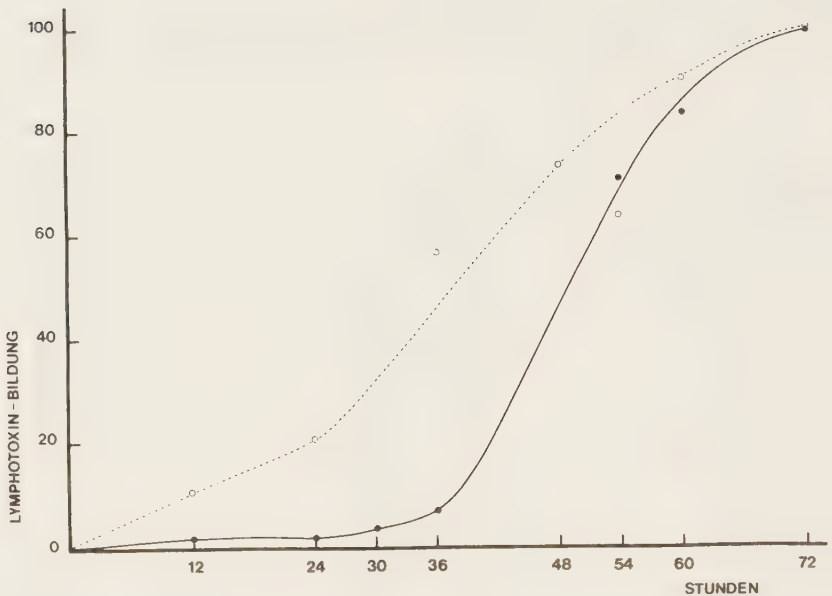


Abb. 4.4.2.1: Kinetik der Lymphotoxin-Bildung und Hemmung der Lymphotoxin-Bildung nach Zugabe von Cycloheximid (Exp. A)

Abszisse: PHA-Inkubation in Stunden (durchgezogene Kurve) bzw. Zeitpunkt der Zugabe von Cycloheximid (gestrichelte Kurve).

Ordinate: Lymphotoxin-Aktivität in Einheiten (s. Kap. 3.8); die Kontrollkultur (ohne Cycloheximid) enthielt nach 72 Stunden absolut 140 Einheiten.

durchgezogene Kurve: Kinetik der Lymphotoxin-Bildung ohne Hemmstoff: Ernte der Überstände zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten.

gestrichelte Kurve: Lymphotoxin-Bildung nach Zugabe von 0,9 µg Cycloheximid/ml zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten; Ernte der Überstände nach 72 Stunden (Hemmstudie).

Jeder Punkt gibt den Mittelwert von Dreifachbestimmungen an.

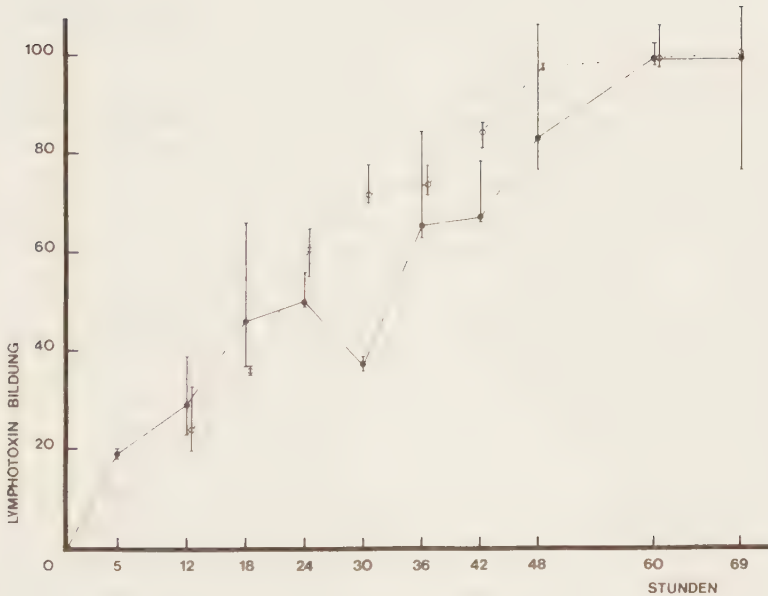


Abb. 4.4.2.2: Kinetik der Lymphotoxin-Bildung und Hemmung der Lymphotoxin-Bildung nach Zugabe von Cycloheximid (Exp. B)

Abszisse: PHA-Inkubation in Stunden (durchgezogene Kurve) bzw. Zeitpunkt der Zugabe von Cycloheximid (gestrichelte Kurve).

Ordinate: Lymphotoxin-Aktivität in Einheiten (s. Kap. 3.8); die Kontrollkultur (ohne Cycloheximid) enthielt nach 69 Stunden absolut 56 Einheiten.
durchgezogene Kurve: Kinetik der Lymphotoxin-Bildung ohne Hemmstoff: Ernte der Überstände zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten.
gestrichelte Kurve: Lymphotoxin-Bildung nach Zugabe von 1,0 µg Cycloheximid/ml zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten, Ernte der Überstände nach 69 Stunden (Hemmstudie).

4.5 Emetin

4.5.1 Der Wirkungsmechanismus von Emetin (Literatur)

Emetin, ein Alkaloid aus *Cephaelis ipecacuanhae*, ist in Form von Ipecac seit über 300 Jahren als Heilmittel verwendet worden. Heute wird es bei parasitären und viralen Infektionen, als Expectorans und Emetikum benutzt; seine Anwendung in der Tumorthherapie wird klinisch erprobt (42).

Emetin hemmt in Eukaryonten die Synthese verschiedener Makromoleküle (40). Die intakte Zelle reichert im Zytoplasma das Alkaloid aus dem umgebenden Medium um das 10- bis 50-fache an (40). Zellwände von Hefen und Bakterien sind für das Emetinmolekül nicht durchgängig (41).

Emetin hemmt irreversibel sowohl die zytoplasmatische als auch die mitochondriale Proteinsynthese (7, 40, 79). Innerhalb weniger Minuten unterbricht es im Zytoplasma die Elongation der Proteinkette (44, 90). Es immobilisiert die Polyribosomenstruktur, indem es den 40S-60S-Komplex stabilisiert und die Ribosomen im Polyribosomenverband fixiert (94). Dadurch wird die Bewegung der Ribosomen entlang der mRNA verhindert (39). Die Peptidyl-tRNA bleibt am Ribosom gebunden (40). Die mitochondriale Proteinsynthese wird nur in isolierten Mitochondrien und durch wesentlich höhere Emetinkonzentrationen gehemmt (7, 79).

Gleichzeitig mit der Proteinsynthesehemmung wird eine ebenso schnelle, irreversible, jedoch unvollständige (max. 80 %-ige) Hemmung der DNS-Synthese beobachtet (40). Diese wird auf den gestörten Proteinstoffwechsel (40) oder eine direkte Reaktion von Emetin mit der DNS zurückgeführt (31, 131).

Auf die RNS-Synthese hat Emetin dosisabhängig einen auf die einzelnen RNS-Typen sich unterschiedlich auswirkenden und anfangs reversiblen Einfluß (31). Konzentrationen, die die Proteinsynthese innerhalb kürzester Zeit völlig blockieren, hemmen verzögert und schwächer die RNS-Synthese (40). Nur

durch 10- bis 100-fach höhere Konzentrationen wird die Synthese der RNS ebenso rasch und vollständig wie die von Protein gehemmt. Dabei wird der Anteil der ribosomalen RNS und ihrer Vorstufen eher vermindert als der der übrigen cytoplasmatischen RNS (31). Ein direktes Eingreifen von Emetin in die Transskription wird hierbei diskutiert (31).

4.5.2 Die Wirkung von Emetin auf die Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation (Dosiswirkungsstudie)

Mit verschiedenen Konzentrationen des Proteinsynthese-Inhibitors Emetin sollte im Lymphozyten-Stimulationstest a) eine die Lymphotoxin-Bildung hemmende Emetin-Dosis bestimmt und b) mit dieser Dosis untersucht werden, ob Proteinneusynthese für die Lymphotoxin-Bildung notwendig ist.

Hierzu wurden PHA-stimulierte Lymphozyten mit verschiedenen Konzentrationen von Emetin inkubiert. Kontrollkulturen erhielten entweder nur PHA, nur Emetin oder blieben unbehandelt. Nach 3 Tagen wurde die Lymphotoxin-Aktivität der zellfreien Medien und in den verbleibenden Lymphozyten die DNS-Synthese ermittelt. Um nur die Lymphotoxin-abhängige Hemmung der HeLa-Zell-DNS-Synthese zu erfassen (siehe Abschnitt: Interferenz von Emetin und Lymphotoxin im DNS-Synthese-Hemmtest), wurden alle Medien dialysiert.

Die Wirkung von Emetin auf die Lymphotoxin-Bildung

Emetin hat in Konzentrationen von $1,1 \times 10^{-7}$ bis $1,1 \times 10^{-5}$ mM keinen Einfluß auf die Lymphotoxin-Bildung. $1,1 \times 10^{-4}$ mM hemmen sie geringfügig. $1,1 \times 10^{-3}$ und $1,1 \times 10^{-2}$ mM Emetin hemmen die Lymphotoxin-Synthese um etwa 80 - 90 %. Eine völlige Blockade läßt sich beidesmal nicht erreichen (Tab. 4.5.2.1 und Tab. 4.5.2.2).

Tab. 4.5.2.1: Wirkung von Emetin auf die Lymphotoxin-Bildung (Experiment A)

Emetin ¹⁾ mM	DNS-Synthese-Hemmtest (cpm 3H-Thymidin-Einbau)		Lymphotoxin-Aktivität Einheiten ⁴⁾
	Kontroll-Medium ²⁾	Lymphotoxin-Medium ³⁾	
0	11.666 ± 1364 ⁵⁾	4.177 ± 726 (-64%) ⁶⁾	100 (74-125)
1,1 x 10 ⁻⁴	12.218 ± 1529	5.346 ± 695 (-56%)	74 (61- 92)
1,1 x 10 ⁻³	11.809 ± 948	10.244 ± 952 (-13%)	14 (10- 19)
1,1 x 10 ⁻²	13.749 ± 521	11.160 ± 641 (-19%)	18 (14- 20)

Legende:

- 1) Emetin-Konzentration in mMol pro ml Lymphozyten-Kultur;
- 2) dialysiertes Medium unstimulierter Lymphozyten-Kulturen;
- 3) dialysiertes Medium stimulierter Lymphozyten-Kulturen;
- 4) Lymphotoxin-Aktivität in Einheiten, berechnet aus der %-Hemmung der DNS-Synthese in den Indikatorzell-Kulturen (siehe Kap. 3.8);
- 5) cpm 3H-Thymidin-Aufnahme/Indikatorzell-Kultur nach Inkubation mit den Lymphozyten-Medien: Mittelwerte von Dreifachbestimmungen + Standardabweichung;
- 6) Hemmung der Indikatorzell -DNS-Synthese in %, berechnet aus der Abnahme der cpm in den Kulturen mit Lymphotoxin-Medium bezogen auf die cpm in den Kulturen mit Kontroll-Medium.

Tab. 4.5.2.2: Wirkung von Emetin auf die Lymphotoxin-Bildung (Experiment B)

Emetin mM ¹⁾	DNS-Synthese-Hemmtest (cpm 3H-Thymidin-Einbau)		Lymphotoxin-Aktivität	
	Kontroll-Medium ²⁾	Lymphotoxin-Medium ³⁾	Einheiten ⁴⁾	
0	14.708 ± 186 ⁵⁾	3.481 ± 363 (-76%) ⁶⁾	100	(91-113)
1,1 x 10 ⁻⁷	13.413 ± 366	3.152 ± 270 (-77%)	104	(91-109)
1,1 x 10 ⁻⁶	14.210 ± 1814	2.645 ± 138 (-81%)	123	(118-129)
1,1 x 10 ⁻⁵	15.969 ± 666	3.397 ± 206 (-79%)	113	(109-118)
1,1 x 10 ⁻⁴	16.442 ± 273	4.365 ± 161 (-73%)	88	(84- 91)
1,1 x 10 ⁻³	14.614 ± 247	13.114 ± 908 (-10%)	6	(5- 7)
1,1 x 10 ⁻²	15.636 ± 447	13.077 ± 549 (-16%)	7	(6- 9)

Legende:

- 1) Emetin-Konzentration in mMol pro ml Lymphozyten-Kultur;
- 2) dialysiertes Medium unstimulierter Lymphozyten-Kulturen;
- 3) dialysiertes Medium stimulierter Lymphozyten-Kulturen;
- 4) Lymphotoxin-Aktivität in Einheiten, berechnet aus der %-Hemmung der DNS-Synthese in den Indikatorzell-Kulturen (siehe Kap. 3.8);
- 5) cpm 3H-Thymidin-Aufnahme/Indikatorzell-Kultur nach Inkubation mit den Lymphozyten-Medien: Mittelwerte von Dreifachbestimmungen ± Standardabweichung;
- 6) Hemmung der Indikatorzell-DNS-Synthese in %, berechnet aus der Abnahme der cpm in den Kulturen mit Lymphotoxin-Medium bezogen auf die cpm in den Kulturen mit Kontroll-Medium.

Tab. 4.5.2.3: Wirkung von Emetin auf die PHA-induzierte Lymphoproliferation

Experiment A:

<u>Emetin</u> mM ¹⁾	<u>Lymphoproliferation</u>	
	cpm 3H-Thymidin-Einbau	%-Hemmung
0	28.484 ± 2531 ²⁾ (143) ³⁾	0 ⁴⁾
1,1 x 10 ⁻⁷	23.332 ± 2101 (334)	18 (2-32)
1,1 x 10 ⁻⁶	25.783 ± 458 (88)	9 (0-18)
1,1 x 10 ⁻⁵	25.118 ± 3467 (62)	12 (0-30)
1,1 x 10 ⁻⁴	22.574 ± 2712 (66)	21 (3-26)
1,1 x 10 ⁻³	49 ± 2 (67)	100
1,1 x 10 ⁻²	34 ± 2 (92)	100
1,1 x 10 ⁻¹	33 ± 6 (30)	100

Experiment B:

<u>Emetin</u> mM ¹⁾	<u>Lymphoproliferation</u>	
	cpm 3H-Thymidin-Einbau	%-Hemmung
0	37.956 ± 3585 ²⁾ (56) ³⁾	0 ⁴⁾
1,1 x 10 ⁻⁷	34.610 ± 1146 (54)	9 (0-22)
1,1 x 10 ⁻⁶	33.960 ± 1934 (54)	11 (0-25)
1,1 x 10 ⁻⁵	41.074 ± 2994 (52)	0 (0-11)
1,1 x 10 ⁻⁴	23.107 ± 1094 (48)	39 (32-49)
1,1 x 10 ⁻³	42 ± 23 (25)	100
1,1 x 10 ⁻²	26 ± 10 (31)	100

Legende:

- 1) Emetin-Konzentration in mMol/ml Lymphozyten-Kultur;
- 2) Lymphoproliferation angegeben als Mittelwert von Dreifachbestimmungen + Standardabweichung der cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Lymphozyten-Kulturen nach Stimulation mit 50 µg PHA;
- 3) cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in nicht-stimulierte Lymphozyten-Kulturen (spontane Lymphoproliferation);
- 4) %-Hemmung der Lymphoproliferation berechnet aus der Abnahme der cpm 3H-Thymidin-Aufnahme der Kulturen mit Emetin, bezogen auf die Kontroll-Kultur (ohne Emetin);
in Klammern: Schwankungsbereich der %-Hemmung.

Die Wirkung von Emetin auf die Lymphoproliferation

$1,1 \times 10^{-7}$ bis $1,1 \times 10^{-5}$ mM Emetin beeinflussen die Lymphoproliferation nicht; $1,1 \times 10^{-4}$ mM führen zu einer mäßigen Hemmung; $1,1 \times 10^{-3}$ bis $1,1 \times 10^{-1}$ mM blockieren sie völlig (Tab. 4.5.2.3).

Der erste hemmende Effekt von Emetin auf Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation macht sich bei ein und derselben Konzentration bemerkbar. Auch die absolute Hemmung beider Parameter wird durch dieselbe Konzentration von Emetin erreicht.

4.5.3 Lymphotoxin-Kinetik und Hemmung der Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation durch Emetin (Kinetikstudie)

In Kinetikstudien wurde mit Emetin in einer die Lymphotoxin-Bildung effektiv hemmenden Dosis (siehe Kap. 4.5.2) die Abhängigkeit der Lymphotoxin-Bildung von der Proteinneusynthese untersucht.

In zellfreien Medien PHA- (Exp. A und B) bzw. Con A-stimulierter (Exp. C) Lymphozyten-Kulturen wurde zu verschiedenen Zeiten nach Stimulation die Lymphotoxin-Aktivität gemessen (Lymphotoxin-Kinetik). Mit dem gleichen Mitogen stimulierten Parallelkulturen wurde exakt zu den "Erntezeiten" der Kinetik-Studie Emetin zugegeben. Die Inkubation wurde fortgesetzt und nach insgesamt 72 bzw. 69 Stunden die Lymphotoxin-Aktivität der zellfreien Medien ermittelt (Hemmstudie). Die Lymphoproliferation wurde in beiden Ansätzen (Kinetik-Studie und Hemmstudie) nach 3 Tagen bestimmt.

Wirkung von Emetin auf Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation in Abhängigkeit vom Zeitpunkt seiner Zugabe nach Mitogen-Stimulation

Unabhängig vom Zeitpunkt der Zugabe blockieren $1,1 \times 10^{-1}$ mM Emetin die Lymphoproliferation völlig (Tab. 4.5.3.1). Unter denselben Versuchsbedingungen üben $1,8 \times 10^{-3}$ Emetin unab-

Tab. 4.5.3.1:

Wirkung von Emetin auf Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation in Abhängigkeit vom Zeitpunkt seiner Zugabe nach Stimulationsbeginn (Experiment A)

Emetin Zugabe-Zeitpunkt	Lymphoproliferation	Lymphotoxin-Bildung
keine Zugabe	39.033 (24)	100
0. Std.	61	0
12. Std.	43	6
24. Std.	42	4
30. Std.	160	11
36. Std.	37	21
48. Std.	35	67
54. Std.	30	91
60. Std.	62	94
72. Std.	190 (43)	100

Legende:

Lymphoproliferation angegeben in cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Lymphozyten-Kulturen nach Stimulation mit 50 µg PHA.
In Klammern: cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in nicht-stimulierte Lymphozyten-Kulturen (spontane Lymphoproliferation).

Lymphotoxin-Bildung angegeben in Einheiten (siehe Kap. 3.8); die Kontroll-Kultur (ohne Emetin) enthielt in diesem Versuch absolut 140 Einheiten.

Außer der Kontroll-Kultur (Zeile 1) erhielt jede Kultur zu den angegebenen Zeiten $1,1 \times 10^{-4}$ mM Emetin.

Alle Werte wurden nach 3-tägiger PHA-Inkubation ermittelt.

Tab. 4.5.3.2:

Wirkung von Emetin auf Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation in Abhängigkeit vom Zeitpunkt seiner Zugabe nach Stimulationsbeginn (Experiment B)

Emetin Zugabe-Zeitpunkt	Lymphoproliferation	Lymphotoxin-Bildung
keine Zugabe	18.381	100
0. Std.	54 (-100%)	0
5. Std.	44 (-100%)	17
12. Std.	69 (-100%)	31
18. Std.	96 (-100%)	25
24. Std.	67 (-100%)	42
30. Std.	120 (- 99%)	60
36. Std.	513 (- 97%)	72
42. Std.	80 (-100%)	82
48. Std.	3.872 (- 79%)	94
60. Std.	6.682 (- 64%)	89
69. Std.	8.419 (- 54%)	100

Legende:

Lymphoproliferation angegeben in cpm ³H-Thymidin-Aufnahme in Lymphozyten-Kulturen nach Stimulation mit 50 µg PHA.
In Klammern: %-Hemmung der Lymphoproliferation berechnet aus Abnahme der cpm ³H-Thymidin-Aufnahme in den Kulturen mit Emetin bezogen auf die Kontroll-Kultur (ohne Emetin).

Lymphotoxin-Bildung angegeben in Einheiten (siehe Kap. 3.8); die Kontroll-Kultur (ohne Emetin) enthielt in diesem Versuch absolut 56 Einheiten.

Außer der Kontroll-Kultur (Zeile 1) erhielt jede Kultur zu den angegebenen Zeiten $1,8 \times 10^{-3}$ mM Emetin.

Alle Werte wurden nach 3-tägiger PHA-Inkubation ermittelt.

Tab. 4.5.3.3:

Wirkung von Emetin auf Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation in Abhängigkeit vom Zeitpunkt seiner Zugabe nach Stimulationsbeginn (Experiment C)

Emetin Zugabe-Zeitpunkt	Lymphoproliferation	Lymphotoxin-Bildung
keine Zugabe	145.474	100
0. Std.	420 (-100%)	0
7. Std.	403 (-100%)	14
16. Std.	631 (-100%)	21
18. Std.	693 (-100%)	23
24. Std.	647 (-100%)	38
32. Std.	3.371 (- 98%)	55
42. Std.	24.826 (- 83%)	72
48. Std.	19.045 (- 87%)	91
56. Std.	20.007 (- 86%)	97
69. Std.	36.685 (- 75%)	100

Legende:

Lymphoproliferation angegeben in cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Lymphozyten-Kulturen nach Stimulation mit 62 µg Con A.
In Klammern: %-Hemmung der Lymphoproliferation berechnet aus der Abnahme der cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in den Kulturen mit Emetin bezogen auf die Kontroll-Kultur (ohne Emetin).

Lymphotoxin-Bildung angegeben in Einheiten (siehe Kap. 3.8); die Kontroll-Kultur (ohne Emetin) enthielt in diesem Versuch absolut 150 Einheiten.

Außer der Kontroll-Kultur (Zeile 1) erhielt jede Kultur zu den angegebenen Zeiten $1,8 \times 10^{-3}$ mM Emetin.

Alle Werte wurden nach 3-tägiger Con A-Inkubation ermittelt.

hängig vom jeweiligen Mitogen (Exp. B wurde mit PHA, Exp. C mit Con A stimuliert) einen geringeren Hemmeffekt auf die Lymphoproliferation aus. Bei später Zugabe (60. - 72. Stunde) dieser Emetin-Dosis wird die Lymphoproliferation auch hier noch um 54 - 75 % gehemmt (Tab. 4.5.3.2 und Tab. 4.5.3.3).

Die Lymphotoxin-Aktivität der zellfreien Medien nimmt mit der Abnahme der "Blockade-Zeit" (je später die Zugabe des Inhibitors erfolgt, desto kürzer ist die Zeitdauer der Inkubation mit ihm) zu. Hierbei macht sich die niedrigere Emetin-Dosis in Exp. B und C im Vergleich zu Exp. A durch einen, bezogen auf den Zeitpunkt der Zugabe, früheren Anstieg der Lymphotoxin-Aktivität bemerkbar (Tab. 4.5.3.1, Tab. 4.5.3.2 und Tab. 4.5.3.3).

Kinetik der Lymphotoxin-Bildung und Hemmung der Lymphotoxin-Bildung nach Zugabe von Emetin

Die Lymphotoxin-Kinetik zeigt die Lymphotoxin-Aktivität zu dem jeweiligen Zeitpunkt. Die Kurve der Lymphotoxin-Kinetik verläuft je nach Versuch mehr oder weniger ausgeprägt "biphasisch": Erster "Gipfel" entspricht dem "frühen" und zweiter "Gipfel" dem "späten" Lymphotoxin.

In allen drei Experimenten hemmt Emetin in der verwendeten Dosis unabhängig vom Mitogen und vom Zeitpunkt der Zugabe schnell und vollständig eine weitere Bildung sowohl des "frühen" als auch des "späten" Lymphotoxins. Es wird somit trotz Weiterinkubation der Kulturen bis zur 69. bzw. 72. Stunde eine dem aktuellen Gehalt bei Zugabe des Inhibitors entsprechende Lymphotoxin-Aktivität gemessen (Abb. 4.5.3.1, Abb. 5.4.3.2 und Abb. 4.5.3.3).

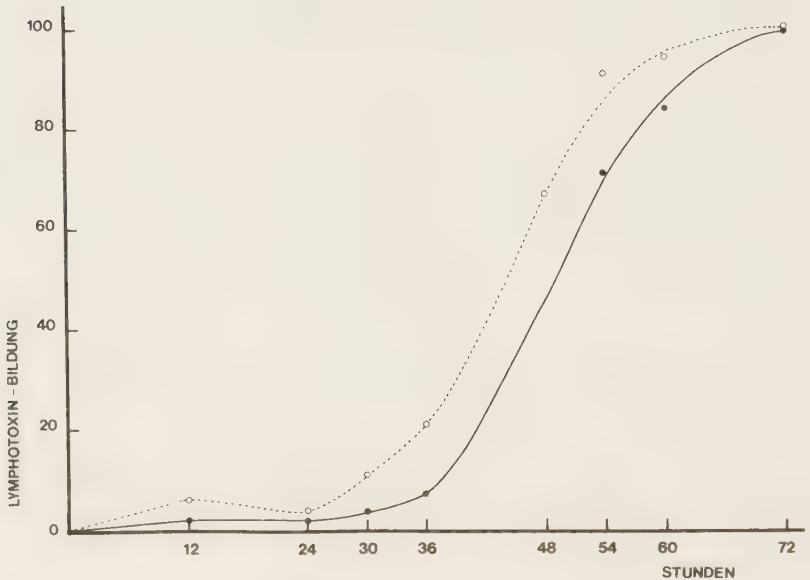


Abb. 4.5.3.1: Kinetik der Lymphotoxin-Bildung und Hemmung der Lymphotoxin-Bildung nach Zugabe von Emetin (Exp. A)

Abszisse: PHA-Inkubation in Stunden (durchgezogene Kurve) bzw. Zeitpunkt der Zugabe von Emetin (gestrichelte Kurve).

Ordinate: Lymphotoxin-Aktivität in Einheiten (s. Kap. 3.8); die Kontrollkultur (ohne Emetin) enthielt nach 72 Stunden absolut 140 Einheiten.

durchgezogene Kurve: Kinetik der Lymphotoxin-Bildung ohne Hemmstoff: Ernte der Überstände zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten.

gestrichelte Kurve: Lymphotoxin-Bildung nach Zugabe von $1,1 \times 10^{-4}$ mM Emetin zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten, Ernte der Überstände nach 72 Stunden (Hemmstudie).

Jeder Punkt gibt den Mittelwert von Dreifachbestimmungen an.

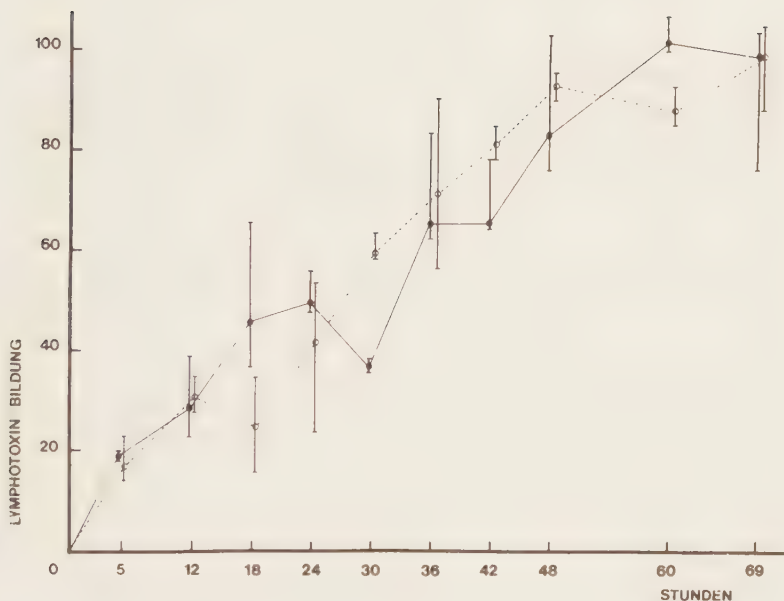


Abb. 4.5.3.2: Kinetik der Lymphotoxin-Bildung und Hemmung der Lymphotoxin-Bildung nach Zugabe von Emetin (Exp. B)

Abszisse: PHA-Inkubation in Stunden (durchgezogenen Kurven) bzw. Zeitpunkt der Zugabe von Emetin (gestrichelte Kurve).

Ordinate: Lymphotoxin-Aktivität in Einheiten (s. Kap. 3.8); die Kontrollkultur (ohne Emetin) enthielt nach 69 Stunden absolut 56 Einheiten.
durchgezogene Kurve: Kinetik der Lymphotoxin-Bildung ohne Hemmstoff: Ernte der Überstände zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten.
gestrichelte Kurve: Lymphotoxin-Bildung nach Zugabe von $1,8 \times 10^{-3}$ mM Emetin zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten, Ernte der Überstände nach 69 Stunden (Hemmstudie).

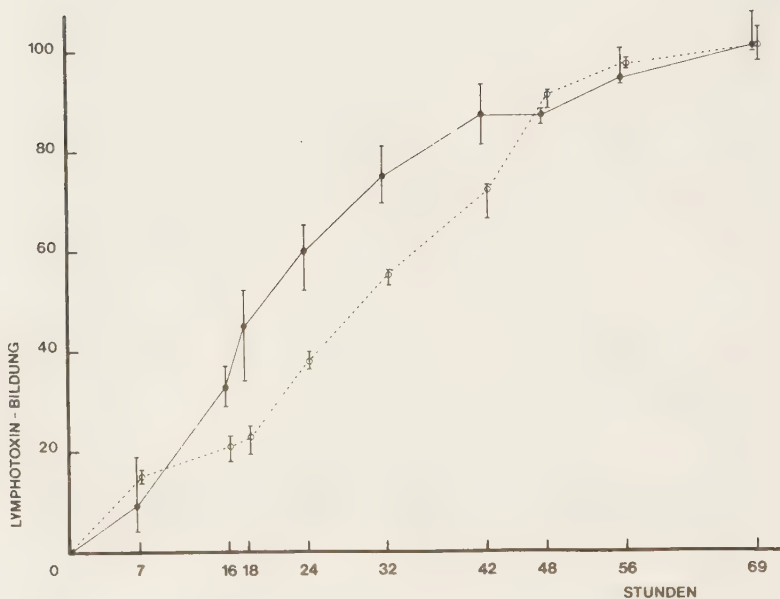


Abb. 4.5.3.3: Kinetik der Lymphotoxin-Bildung und Hemmung der Lymphotoxin-Bildung nach Zugabe von Emetin (Exp. C)

Abszisse: Con A-Inkubation in Stunden (durchgezogene Kurve) bzw. Zeitpunkt der Zugabe von Emetin (gestrichelte Kurve).

Ordinate: Lymphotoxin-Aktivität in Einheiten (s. Kap. 3.8); die Kontrollkultur (ohne Emetin) enthielt nach 69 Stunden absolut 150 Einheiten.
durchgezogene Kurve: Kinetik der Lymphotoxin-Bildung ohne Hemmstoff: Ernte der Überstände zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten.
gestrichelte Kurve: Lymphotoxin-Bildung nach Zugabe von $1,8 \times 10^{-5}$ mM Emetin zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten; Ernte der Überstände nach 69 Stunden (Hemmstudie).

4.5.4 Die Interferenz von Lymphotoxin und Emetin im DNS-Synthese-Hemmtest

Die zellfreien Medien von Lymphozyten-Kulturen, die mit Emetin behandelt wurden, enthalten den Hemmstoff in einer unbekannten Menge. Im Folgenden haben wir daher untersucht, ob Emetin die Wirkung von Lymphotoxin im DNS-Synthese-Hemmtest beeinflusst.

HeLa-Zellen wurden mit bekannten Lymphotoxin-Mengen und steigenden Konzentrationen von Emetin inkubiert. Nach 48 Stunden wurde die DNS-Synthese der Kulturen bestimmt.

Emetin allein beeinflusst in Konzentrationen von $2,8 \times 10^{-8}$ bis $2,8 \times 10^{-5}$ mM die DNS-Synthese der HeLa-Zellen nicht; mit $2,8 \times 10^{-4}$ mM hemmt es sie um 41 %, mit $2,8 \times 10^{-3}$ und $2,8 \times 10^{-2}$ mM blockiert Emetin die DNS-Synthese völlig (Tab. 4.5.4, Spalte 2 : 0 Einheiten Lymphotoxin). Lymphotoxin-haltiges Medium hemmt die DNS-Synthese der HeLa-Zellen je nach seiner Aktivität (Tab. 4.5.4, Zeile 1: ohne Emetin).

Bei gleichzeitiger Inkubation mit $2,8 \times 10^{-8}$ bis $2,8 \times 10^{-5}$ mM Emetin bleibt die Lymphotoxin-Aktivität der Medien mit 50 und 100 Einheiten gegenüber der Kontrollkultur (ohne Emetin) unverändert, während 10 Einheiten Lymphotoxin zusammen mit Emetin zu einer stärkeren Hemmung führen als Lymphotoxin allein (Abb. 4.5.4, Kurven b - e). Zusammen mit höheren Emetin-Dosen ist der Lymphotoxin-Effekt im DNS-Synthese-Hemmtest nicht mehr bestimmbar (Abb. 4.5.4, Kurven f - h).

Daraus ergab sich die Notwendigkeit, alle Medien der Dosiswirkungs- und Kinetikstudien vor Austestung im DNS-Synthese-Hemmtest zu dialysieren.

Tab. 4.5.4: Interferenz von Lymphotoxin und Emetin im DNS-Synthese-Hemmtest

Emetin mM ¹⁾	Lymphotoxin-Aktivität		
	0 Einheiten	10 Einheiten	50 Einheiten
0	6.689 ²⁾	6.299 (- 6%) ³⁾	1.718 (-74%)
2,8 x 10 ⁻⁸	6.511	5.181 (-20%)	1.457 (-78%)
2,8 x 10 ⁻⁷	7.345	5.870 (-20%)	1.296 (-80%)
2,8 x 10 ⁻⁶	7.032	5.085 (-28%)	1.472 (-80%)
2,8 x 10 ⁻⁵	6.498	3.878 (-40%)	1.326 (-81%)
2,8 x 10 ⁻⁴	3.939	3.953 (- 0%)	2.122 (-67%)
2,8 x 10 ⁻³	264	324	2.707 (-31%)
2,8 x 10 ⁻²	143	133	170
			72

Legende:

- 1) Emetin-Konzentration in mMol pro ml Indikatorzell-Kultur;
- 2) cpm 3H-Thymidin-Aufnahme/Indikatorzell-Kultur: Mittelwerte von Dreifachbestimmungen; Abweichungen der Einzelwerte vom Mittelwert lagen in jedem Ansatz unter 15%;
- 3) Hemmung der Indikatorzell-DNS-Synthese in %, bezogen auf die jeweilige Kontroll-Kultur (0 Einheiten Lymphotoxin).

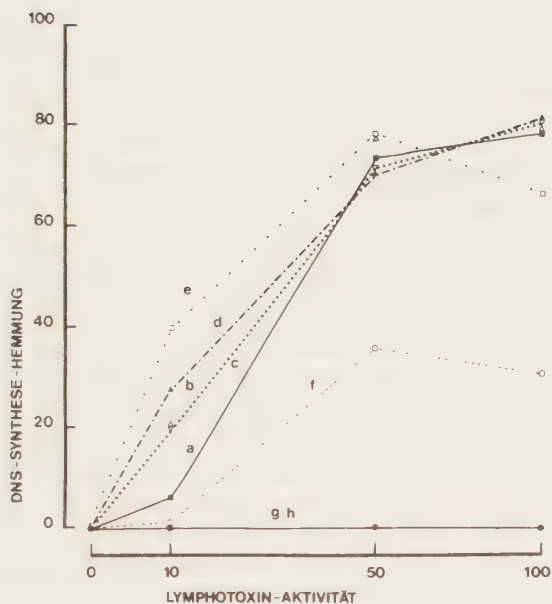


Abb. 4.5.4: Hemmung der HeLa-DNS-Synthese durch Lymphotoxin in Anwesenheit steigender Emetin-Konzentrationen

Abszisse: Einheiten Lymphotoxin zugegeben zu HeLa-Zellkulturen

Ordinate: Hemmung (in Prozent) der HeLa-Zell-DNS-Synthese (^3H -Thymidin-Aufnahme) bezogen auf die jeweilige Kontrollkultur ohne Lymphotoxin (siehe Tab. 4.5.4).

Die Kurven entsprechen Kulturen:

- a) ohne Emetin;
- b) mit $2,8 \times 10^{-8}$ mM Emetin;
- c) mit $2,8 \times 10^{-7}$ mM Emetin;
- d) mit $2,8 \times 10^{-6}$ mM Emetin;
- e) mit $2,8 \times 10^{-5}$ mM Emetin;
- f) mit $2,8 \times 10^{-4}$ mM Emetin;
- g-h) mit $2,8 \times 10^{-3}$ bis $2,8 \times 10^{-2}$ mM Emetin.

Jeder Punkt gibt den Mittelwert von Dreifachbestimmungen an.

4.6 Chloramphenicol

4.6.1 Der Wirkungsmechanismus von Chloramphenicol (Literatur)

Chloramphenicol, 1947 zum ersten Mal aus *Streptomyces venezuela* isoliert (14), hemmt reversibel in vitro und in vivo die Proteinsynthese von Prokaryonten (27, 45, 88).

Chloramphenicol bindet sich reversibel an den Acceptorbezirk der ribosomalen 50S-Untereinheit (75, 128, 130) und verhindert die Proteinketten-Elongation (28). Der genaue Wirkungsmodus hierbei ist noch umstritten. Chloramphenicol soll die Bindung des Aminoacyl-Terminus der beladenen tRNS an das Ribosom hemmen (75, 95, 98). Ein Konkurrieren von Chloramphenicol mit dem 3'-Ende der tRNS um die Peptidyl-Transferase wird diskutiert (96, 97). Strukturänderungen der mit Chloramphenicol-beladenen Ribosomen sollen eine funktionelle Bindung der Aminoacyl- und/oder Peptidyl-tRNS an die Peptidyl-Transferase verhindern (43, 44). Die Bewegung der Ribosomen entlang der mRNA soll durch Chloramphenicol geblockt (28), oder nur verlangsamt werden (43, 44).

Nach kurzer Inkubationsdauer mit Chloramphenicol wird durch die verlangsamte Bewegung der Ribosomen entlang der mRNA der Polysomenverband stabilisiert (11, 22). Bei längerer Einwirkungszeit wird die Auflösung der Polysomen und die Bindung neusynthetisierter mRNA an Ribosomen beobachtet (43, 44). Bei durch Chloramphenicol gehemmter Protein-Synthese kann es intrazellulär in Abhängigkeit vom Medium zu einer erheblichen Akkumulation von RNS und Ribonucleoproteinpartikel atypischer Sedimentationskonstanten kommen (92, 129). In Anwesenheit von Chloramphenicol wird die RNS-Synthese-Rate bei geringem Aminosäure-Angebot im Medium um das 2- bis 3-fache erhöht, bei angereichertem Medium jedoch kaum gesteigert (23).

In der eukaryonten Zelle ist nur die mitochondriale und chloroplastische Proteinsynthese Chloramphenicol-sensitiv (29,68). In vivo ist eine Hemmung der Antigen-induzierten AK-Bildung in Lymphozyten (1) und RNS- und Proteinsynthese-Hemmung in verschiedenen Zellen nachgewiesen worden (32). Da dies im Vergleich zur antibakteriellen Wirkung von Chloramphenicol nur in höheren Konzentrationen, nach längeren Inkubationszeiten (Stunden-Tage) und auch bei Anwendung ansonsten inaktiver Stereoisomere beobachtet wird, nimmt man hierfür einen anderen, noch unbekannten Reaktionsmodus an (28, 96).

4.6.2 Die Wirkung von Chloramphenicol auf die Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation (Dosiswirkungsstudie)

Es wurde untersucht, ob Chloramphenicol, ein Hemmstoff der prokaryoten Proteinsynthese, auch die Lymphotoxin-Bildung und Lymphoproliferation beeinflusst.

PHA-stimulierte (50 $\mu\text{g}/\text{Kultur}$) Lymphozyten wurden 3 Tage lang mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chloramphenicol inkubiert. Kontrollkulturen erhielten entweder nur PHA, nur den Inhibitor oder blieben unbehandelt. Anschließend wurde die Lymphotoxin-Aktivität der zellfreien, undialysierten Medien und die Proliferation der Lymphozyten bestimmt.

Medien der mit $1,8 \times 10^{-5}$ bis $1,8 \times 10^{-1}$ mM Chloramphenicol inkubierten Lymphozyten haben im DNS-Synthese-Hemmtest die gleiche Lymphotoxin-Aktivität wie das Medium der Kontrollkultur (ohne Chloramphenicol). Die Lymphotoxin-Bildung scheint somit durch diese Chloramphenicol-Dosen nicht beeinflusst zu werden (vgl. %-Hemmung und Absolutwerte der cpm).

Medien von PHA-stimulierten und mit 1,8 und 18.0 mM Chloramphenicol inkubierten Lymphozyten hemmen die HeLa-Zellen genauso stark wie das Medium der Kontroll-Kultur (ohne Inhibitor). Dagegen verringern Medien unstimulierter aber mit den gleichen Chloramphenicol-Dosen behandelten Lymphozyten gegen-

Tab. 4.6.2.1: Wirkung von Chloramphenicol auf die Lymphotoxin-Bildung

<u>Chloramphenicol</u> mM ¹⁾	<u>DNS-Synthese-Hemmtest</u> (cpm ³ H-Thymidin-Einbau)		<u>Lymphotoxin-Aktivität</u> %-Hemmung ⁴⁾
	Kontroll-Medium ²⁾	Lymphotoxin-Medium ³⁾	
0	14.449 ± 140 ⁵⁾	3.967 ± 386	-73%
1,8 x 10 ⁻⁵	17.120 ± 1468	2.687 ± 158	-84%
1,8 x 10 ⁻⁴	17.246 ± 1493	3.863 ± 816	-78%
1,8 x 10 ⁻³	17.362 ± 133	3.046 ± 85	-82%
1,8 x 10 ⁻²	17.634 ± 183	4.459 ± 189	-75%
1,8 x 10 ⁻¹	16.747 ± 97	3.399 ± 373	-80%
1,8	10.813 ± 234	5.169 ± 423	-52%
18,0	4.195 ± 110	3.311 ± 180	-21%

Legende:

- 1) Chloramphenicol-Konzantration in mMol pro ml Lymphozyten-Kultur;
- 2) Medium unstimulierter Lymphozyten-Kulturen;
- 3) Medium stimulierter Lymphozyten-Kulturen;
- 4) Lymphotoxin-Aktivität angegeben in %-Hemmung der Indikatorzell-DNS-Synthese, berechnet aus der Abnahme der cpm in den Kulturen mit Lymphotoxin-Medium bezogen auf die cpm der Kulturen mit Kontroll-Medium;
- 5) cpm ³H-Thymidin-Aufnahme/Indikatorzell-Kultur nach Inkubation mit den Lymphozyten-Medien: Mittelwerte von Dreifachbestimmungen ± Standardabweichung.

Tab. 4.6.2.2:

Wirkung von Chloramphenicol auf die PHA-induzierte Lymphoproliferation

<u>Chloramphenicol</u> mM ¹⁾	<u>Lymphoproliferation</u>	
	cpm 3H-Thymidin-Einbau	%-Hemmung
0	18.029 ± 1571 ²⁾ (96) ³⁾	0 ⁵⁾
1,8 x 10 ⁻⁵	21.426 ± 801 (121)	0 ⁴⁾
1,8 x 10 ⁻⁴	21.912 ± 1060 (95)	0 ⁴⁾
1,8 x 10 ⁻³	22.626 ± 1340 (124)	0 ⁴⁾
1,8 x 10 ⁻²	23.928 ± 1362 (196)	0 ⁴⁾
1,8 x 10 ⁻¹	22.620 ± 2831 (173)	0 ⁴⁾
1,8	15.808 ± 459 (115)	12
18,0	43 ± 3 (27)	100

Legende:

- 1) Chloramphenicol-Konzentration in mMol pro ml Lymphozyten-Kultur;
- 2) Lymphoproliferation angegeben als Mittelwert von Dreifachstimulationen ± Standardabweichung der cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Lymphozyten-Kulturen nach Stimulation mit 50 µg PHA;
- 3) cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in nicht-stimulierte Lymphozyten-Kulturen (spontane Lymphoproliferation);
- 4) höhere 3H-Thymidin-Aufnahme als in der stimulierten Kontroll-Kultur (ohne Chloramphenicol);
- 5) %-Hemmung der Lymphoproliferation berechnet aus der Abnahme der cpm 3H-Thymidin-Aufnahme der Kulturen mit Chloramphenicol bezogen auf die Kontroll-Kultur (ohne Chloramphenicol).

über der Kontroll-Kultur die DNS-Synthese der Indikatorzellen (siehe: die letzten beiden Zeilen). Da bei diesem Versuch der Inhibitor nicht aus den Medien dialysiert wurde, werden im DNS-Synthese-Hemmtest sowohl die Wirkung von Lymphotoxin als auch Chloramphenicol erfaßt. Somit kann eine Veränderung der Lymphotoxin-Bildung durch die beiden höchsten Chloramphenicol-Konzentrationen mit diesem Test nicht eindeutig festgestellt werden (siehe Tab. 4.6.2.1 und vgl. Abschnitt: Interferenz von Lymphotoxin und Chloramphenicol im DNS-Synthese-Hemmtest).

Die Lymphoproliferation bleibt nach Inkubation mit $1,8 \times 10^{-5}$ bis $1,8 \times 10^{-1}$ mM Chloramphenicol unverändert. Durch 1,8 mM Chloramphenicol wird sie um 12 % gehemmt, durch 18,0 mM völlig blockiert (siehe Tab. 4.6.2.2).

4.6.3 Die Interferenz von Lymphotoxin und Chloramphenicol im DNS-Synthese-Hemmtest

Die zellfreien Medien der Konzentrationsstudie enthalten noch Chloramphenicol, das die Beurteilung der Lymphotoxin-Aktivität im DNS-Synthese-Hemmtest stört. Um den Anteil an der DNS-Synthese-Hemmung von den beiden Stoffen zu beurteilen, wurden HeLa-Zellen mit Medien bekannter Lymphotoxin-Aktivität und unterschiedlichen Chloramphenicol-Konzentrationen inkubiert. Nach 48 Stunden wurde die DNS-Synthese bestimmt.

Ohne Lymphotoxin hemmt Chloramphenicol die HeLa-DNS-Synthese ab einer Konzentration von 5×10^{-1} mM. Im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich beeinflußt Chloramphenicol die Wirkung von 100 Lymphotoxin-Einheiten (gemessen als cpm) auf die Indikatorzellen nicht. 5×10^{-6} bis 5×10^{-1} mM verändern den zytotoxischen Effekt (bestimmt in %-Hemmung) von Medien mittlerer und schwacher Lymphotoxin-Aktivität nicht. 5 mM Chloramphenicol beeinflussen die Bestimmung der Lymphotoxin-Aktivität im DNS-Synthese-Hemmtest (Tab. 4.6.3).

Tab. 4.6.3: Interferenz von Lymphotoxin und Chloramphenicol im DNS-Synthese-Hemmtest

Chloramphenicol mM ¹⁾	Lymphotoxin-Aktivität			
	0 Einheiten	10 Einheiten ⁴⁾	50 Einheiten	100 Einheiten
0	25.579 ²⁾	21.042 (-18%) ³⁾	4.946 (-81%)	3.013 (-89%)
5 x 10 ⁻⁶	23.280	18.032 (-23%)	5.808 (-76%)	3.518 (-85%)
5 x 10 ⁻⁵	25.900	20.284 (-22%)	5.429 (-80%)	3.654 (-86%)
5 x 10 ⁻⁴	26.214	19.307 (-27%)	6.298 (-76%)	3.459 (-87%)
5 x 10 ⁻³	23.559	19.095 (-19%)	4.576 (-81%)	3.211 (-87%)
5 x 10 ⁻²	24.934	21.766 (-13%)	6.160 (-76%)	3.630 (-86%)
5 x 10 ⁻¹	18.423	15.026 (-19%)	3.780 (-80%)	2.639 (-86%)
5	8.040	7.252 (-10%)	3.064 (-62%)	2.799 (-66%)

Legende:

- 1) Chloramphenicol-Konzentration in mMol pro ml Indikatorzell-Kultur;
- 2) cpm 3H-Thymidin-Aufnahme/Indikatorzell-Kultur: Mittelwerte von Dreifachbestimmungen; Abweichungen der Einzelwerte vom Mittelwert lagen in jedem Ansatz unter 15%;
- 3) Hemmung der Indikatorzell-DNS-Synthese in %, bezogen auf die jeweilige Kontroll-Kultur (0 Einheiten Lymphotoxin);
- 4) Verdünnungen eines Lymphotoxin-Standards.

5 Diskussion

Die Lymphotoxine werden in vitro von stimulierten Lymphozyten gebildet und in das umgebende Medium sezerniert; sie lassen sich durch verschiedene biologische Verfahren nachweisen. Die Lymphotoxine werden zu den Mediatoren der zellulären Immunreaktion und damit zu den Effektor-Molekülen des zellulären, thymusabhängigen Immunsystems gerechnet. Obwohl es gelungen ist, die Lymphotoxine in verschiedene Klassen einzuteilen und einzelne Moleküle zu isolieren, sind derzeit weder die physiologische (in vivo) Funktion, noch die Struktur oder die Biosynthese der Faktoren in aktivierten Lymphozyten hinreichend bekannt. Die vorliegende Arbeit hat sich zur Aufgabe gestellt, die Biosynthese der Lymphotoxine durch gezielte Hemmung einzelner Syntheseschritte zu untersuchen.

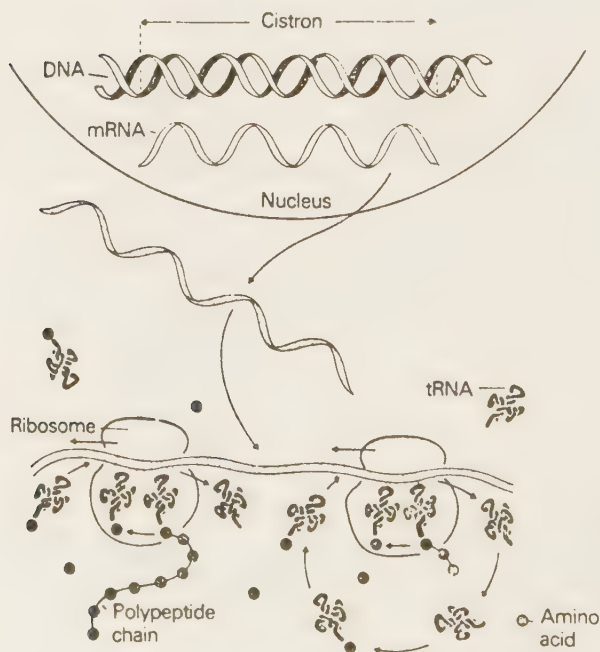


Abb. 5.0

Mechanismus der
Proteinsynthese

(aus: Textbook of
pharmacology 1980
eds. Bowman & Rand)

Da die Lymphotoxine Glykoproteine sind, kann man für ihre Bildung den Mechanismus der Proteinsynthese voraussetzen (siehe Abb. 5.0). Die genetische Information ist in der DNS gespeichert. Vermutlich enthalten das Gen oder die Gene nichtkodierende Sequenzen (Introns). Die Transskription wird somit Präkursor-RNS liefern, die prozessiert werden muß. Die reife mRNA wird im Zytoplasma vermutlich am endoplasmatischen Reticulum in Protein übersetzt und dann in dessen Hohlraumssystem sezerniert. Erst dann erfolgt die Glykosylierung und Freisetzung.

Wir untersuchten in dieser Arbeit die Abhängigkeit der Lymphotoxin-Bildung von den einzelnen Proteinbiosyntheseschritten mit folgenden Hemmstoffen der

DNS-Synthese und -Replikation:

Hydroxyurea: Hemmung der Purinsynthese,

Mitomycin C: Alkylierung der DNS-Doppel-Helix;

RNS-Synthese:

Actinomycin D: Hemmung der Transskription;

zytoplasmatischen Proteinsynthese:

Puromycin: Hemmung der Peptid-Synthetase,

Cycloheximid: Hemmung der Translokation;

mitochondrialen Proteinsynthese:

Chloramphenicol: Hemmung der Peptid-Synthetase.

Weiterhin verwendeten wir als Hemmstoff der Proteinsynthese Emetin und als Hemmstoff des Membranstoffwechsels und der Mikrofilamentenaktivität Cytochalasin B (siehe auch 2a).

5.1 Lymphotoxin-Bildung bei Blockierung der DNS-Synthese

Mitogen-stimulierte Lymphozyten beginnen etwa 24 Stunden nach Mitogenzugabe vermehrt DNS zu bilden (87). Die maximale Thymidin-Aufnahme in die Zelle erfolgt nach 60 - 72 Stunden und fällt danach wieder ab (87, 57). Einige Autoren vertreten die Meinung, daß die in Mitogen-stimulierten Lymphozyten beobachtete DNS-Synthese nicht allein Ausdruck der Genreplikation sei (57). Die Mitogen-induzierte DNS enthält Sequenzen, die nur zu 10 % dem Genom entsprechen, und wird in das Inkubationsmedium sezerniert (57). Im Gegensatz zu früheren Vorstellungen (80) soll sich die Mehrzahl der DNS-synthetisierenden Zellen anschließend nicht teilen (46, 57).

Obwohl sich die Zytotoxizität parallel zur Lymphoproliferation in den Mitogen-stimulierten Kulturen entwickelt (136), ist die Notwendigkeit der Proliferation für die Lymphotoxin-Bildung fraglich (108). LUCAS (82) fand, daß Lymphotoxin-Bildung und DNS-Synthese in stimulierten Lymphozyten-Kulturen nicht quantitativ korrelieren. KRAMER und GRANGER (66) untersuchten den Zusammenhang von DNS-Synthese und Lymphotoxin-Bildung in Abhängigkeit von der Zeit und fanden, daß während der ersten 24 Stunden Lymphotoxin-Bildung ohne DNS-Synthese prinzipiell möglich, die dabei erreichte Aktivität jedoch gering ist. Maximale Lymphotoxin-Bildung erforderte eine gesteigerte DNS-Synthese. Beide Parameter erreichten am 3. Tag nach Stimulation ihre Maxima gleichzeitig. Der anschließende Abfall der DNS-Synthese ließ keinen weiteren Anstieg der Lymphotoxin-Bildung zu; sie blieb jedoch auf gleichbleibendem Niveau. Aus diesen Beobachtungen postulierten die Autoren die Existenz einer Lymphotoxin-bildenden, primär nicht proliferierenden Zelle und einer proliferierenden, DNS-synthetisierenden Helferzelle, deren Anwesenheit zur maximalen Syntheseleistung der Lymphotoxin-bildenden Zelle notwendig ist. Bereits ältere Untersuchungen hatten jedoch durch Hemmung der induzierten DNS-Synthese und Zellproliferation mit Stoffwechselinhibitoren, Röntgenstrahlen und hohen Thymidin-Konzentrationen keinen Einfluß auf die Lymphotoxin-Bildung nachweisen können (38, 108, 139).

Wir konnten mit Mitomycin C, einem selektiven und irreversiblen Hemmstoff der Replikation die Lymphoproliferation völlig blockieren und erhielten dabei dieselbe Lymphotoxin-Aktivität wie in der Kontroll-Kultur ohne Mitomycin C. Die "Dissoziation" der beiden Lymphozytenfunktionen spricht für die Unabhängigkeit der Lymphotoxin-Bildung von der DNS-Synthese. Die Zellen der Kontroll-Kultur, die ungehindert DNS synthetisieren und proliferieren konnten, bildeten ebensoviel Toxin wie die Zellen, deren DNS-Synthese durch Mitomycin C blockiert war und die nicht proliferierten. Die Vorstellung einer proliferierenden Helferzelle, die erst eine maximale Lymphotoxin-Bildung möglich macht, ließ sich mit diesem Versuch somit nicht bestätigen.

Verwendeten wir Mitomycin C in niedrigen Konzentrationen, die keinen hemmenden Einfluß auf die Lymphoproliferation zeigten, fanden wir eine Steigerung der Lymphotoxin-Bildung um 20 - 60%. Dies wurde bereits von anderen Untersuchern sowohl nach Mitomycin C-Behandlung als auch nach Röntgenbestrahlung von Lymphozyten beschrieben (16). Eine interessante Parallele bietet hierzu das bei der Interferon-Synthese beobachtete Phänomen der "Superinduktion". Nach Vorinkubation der Zellen mit Protein- und RNS-Synthese-Inhibitoren kommt es zu einer überschießenden Interferon-Produktion. Dies soll durch Synthesehemmung eines für die Regulation der Interferonbildung verantwortlichen Repressormoleküls zustande kommen (48, 117, 123). Die Mitomycin-induzierte "Superinduktion" der Lymphotoxin-Bildung ließe sich folgendermaßen erklären. Mitomycin C könnte in diesen niedrigen Konzentrationen bereits eine transiente Alkylierung der DNS und Hemmung der Replikation bewirken, die so schnell repariert wird, daß sie im Thymidin-Einbau nicht erfaßt wird (6, 76, 124). Die transiente Replikationshemmung der Lymphotoxin-produzierenden Zellpopulation könnte eine Änderung der Genexpression mit Steigerung der Lymphotoxin-Bildung zur Folge haben (16). Auch ist die alleinige Messung der ³H-Thymidinaufnahme in die Zelle als Ausdruck der DNS-Synthese-Rate eine grobe Methode; sie vernachlässigt Änderungen des intrazellu-

lären Thymidinpools, der Aktivität der Thymidinkinase und des Plasmamembrancarriersystems für Thymidin (118). Weiterhin geht aus einer Reihe von Untersuchungen hervor (57), daß die Lymphoproliferation und unter anderem die Lymphotoxin-Bildung nicht allein Folge der Interaktion zwischen einer individuellen Lymphoidzelllinie mit dem Mitogenmolekül, sondern ein komplexes Geschehen verschieden differenzierter Zelltypen untereinander ist. Somit ist auch eine Mitomycin C-induzierte Proliferationshemmung von Suppressor-T-Zellen zu diskutieren. Dafür spricht auch, daß die PHA-sensiblen Zellen besonders unter den Suppressor-T-Zellen zu finden sind (57).

In höheren Konzentrationen beeinflußt Mitomycin C auch die RNS- und Proteinsynthese (49, 74, 84). Bei der 70 %-igen Hemmung der Lymphotoxin-Bildung durch höhere Mitomycin C-Dosen können wir deshalb eine unspezifisch toxische Wirkung des Inhibitors nicht ausschließen (vergl. S.88 Mitte).

Mit Hydroxyurea, einem über die Nukleosidsynthese indirekt auf die DNS-Synthese wirkenden Hemmstoff, untersuchten wir nochmals die Abhängigkeit der Lymphotoxin-Bildung von der Lymphoproliferation. Hydroxyurea hemmt die induzierte DNS-Synthese in Lymphozyten (46, 113). Sein Hemmeffekt ist stärker, wenn es während der Zeit der maximalen DNS-Synthese zugegeben wird, als wenn es zugleich mit dem Mitogen auf die Kultur kommt (46). Unabhängig vom Zeitpunkt der Zugabe soll Hydroxyurea nach mehr als 24 Stunden auch die Proteinsynthese der Lymphozyten um die Hälfte vermindern (46). Nach mehr als 50 Stunden ist es für Lymphozyten toxisch (113). In der uns zugänglichen Literatur fanden wir über die Wirkung von Hydroxyurea speziell auf die Lymphotoxin-Bildung keine Angaben.

Die induzierte DNS-Synthese der Lymphozyten ließ sich übereinstimmend mit anderen Autoren durch 10 - 100 mM Hydroxyurea blockieren. Hydroxyurea verminderte in diesem Dosisbereich auch die Lymphotoxin-Bildung. Bei der langen Einwirkungsdauer des Inhibitors auf die Lymphozyten muß der in der Literatur beschriebene direkte Hemmeffekt von Hydroxyurea auf die Protein-Synthese jedoch berücksichtigt werden (vergl. S.88 Mitte).

Con A aktiviert andere Subpopulationen der T-Lymphozyten als PHA (21, 26). Nach PHA-Stimulation fanden wir einen mehr oder weniger ausgeprägten "biphasischen" Verlauf der Lymphotoxin-Kinetik-Kurve mit einem Plateau nach 60 Stunden. Nach Con A-Stimulation stieg die Lymphotoxin-Aktivität bereits von Anfang an annähernd linear an und erreichte bereits nach 2 Tagen das Maximum. In dieser Arbeit haben wir angenommen, daß die durch PHA und Con A induzierten Lymphotoxine identisch sind. Für die Wirkung der einzelnen Stoffwechsellinhibitoren - so auch für Hydroxyurea - spielte es keine Rolle, ob die Lymphozyten mit PHA oder Con A stimuliert wurden.

Hydroxyurea beeinflusste in der Kinetikstudie die Lymphotoxin-Bildung während der ersten 32 bzw. 36 Stunden nicht. Danach stieg die Lymphotoxin-Aktivität jedoch nicht weiter an und blieb im Vergleich zur Kontrollkultur (ohne Hydroxyurea) bis zuletzt unter der 50 %-Grenze. Da die Wirkung von Hydroxyurea auf die S-Phase des Zellzyklus beschränkt ist (65, 99), trat wie erwartet während der ersten Stunden keine Veränderung der Lymphotoxin-Bildung ein. Berücksichtigen wir die mit Mitomycin gefundene Unabhängigkeit der Lymphotoxin-Bildung von der Lymphoproliferation, dann müssen wir die Hemmung der Lymphotoxin-Bildung ab der 30. Stunde auf den in der Literatur bereits beschriebenen direkten Hemmeffekt von Hydroxyurea auf die Proteinsynthese zurückführen. Andererseits hemmt Hydroxyurea die Replikation und damit die Zellproliferation. Nehmen wir an, daß somit die Zellzahl im Gegensatz zur Kontrollkultur (ohne Hydroxyurea) nicht zunimmt, so können wir eine quantitative Korrelation zwischen Zellproliferation bzw. Zellzahl und Lymphotoxin-Gehalt - vor allem nach der 30. Stunde - nicht ausschließen.

Aufgrund einer unterschiedlichen Länge der G_1 -Phase treten nicht alle Lymphozyten einer Mitogen-stimulierten Kultur gleichzeitig in die S-Phase des Zellzyklus ein (13). Der Übergang von der frühen in die späte G_1 -Phase ist für die Lymphoproliferation ein entscheidender Punkt, der die Anwesenheit des

Mitogens erfordert - und bei Vorhandensein des Mitogens - dosisabhängig früher oder später erreicht wird (57). Bleibt Hydroxyurea - wie in unserem Versuch - über die Dauer der G_1 -Phase in der Kultur, akkumulieren die Zellen am Ende dieses Zellzyklusabschnitts; die Zellpopulation wird synchronisiert (99). Aus dieser Konstellation ergibt sich für zukünftige Untersuchungen die interessante Frage, was passiert, wenn Hydroxyurea am Ende der G_1 -Phase aus der Kultur entfernt wird und die Zellen nochmals stimuliert werden. Können Lymphozyten in Anwesenheit des Hemmstoffs überhaupt in die späte G_1 -Phase treten und führt die Synchronisation der Zellen zu einem rascheren - wie für die DNS-Synthese beschriebenen (113) - Anstieg der Lymphotoxin-Aktivität. Mit diesem Versuchsaufbau - nämlich insgesamt kürzerer Inkubationszeit mit Hydroxyurea - würde dann auch der unspezifische Effekt des Inhibitors auf die Proteinsynthese wegfallen.

In den Dosiswirkungsstudien mit Mitomycin C und Hydroxyurea finden wir nach 72 Stunden in den Medien bei völlig blockierter Lymphoproliferation eine jeweilige Restaktivität von 10 - 30 Lymphotoxin-Einheiten. Testschwankungen miteinbezogen entspricht dies den 20 - 40 Lymphotoxin-Einheiten, die während der ersten 30 Stunden in der Hydroxyurea-Kinetik gebildet worden sind. Somit ist die Lymphotoxin-Bildung während der ersten 30 Stunden proliferationsunabhängig und macht 20 - 40 % der in 72 Stunden erreichten Gesamtaktivität aus. Für die spätere Lymphotoxin-Bildung ist eine Lymphoproliferation bzw. DNS-Neusynthese notwendig.

5.2 Lymphotoxin-Bildung bei Blockierung der RNS-Synthese

WETTENHALL et al. (138) beschreiben für den ruhenden Lymphozyten einen großen Pool inaktiver mRNS. Unter Mitogeneinfluß werden schnelle Aktivierung dieser mRNS und ein vermehrter RNS-Shift vom Nucleus ins Zytoplasma beobachtet (85, 87, 138). Die mRNS-Stabilität nimmt zu (59, 87). Die freien Ribosomen formen Polysomen und der Gehalt an methylierter tRNS steigt (9, 110). Der Beginn der Lymphotoxin-Synthese unter Mitogeneinfluß erscheint zu früh, als daß die Transskription neuer mRNS hierfür notwendig ist (57). Einige Autoren Autoren fanden nach Hemmung der RNS-Synthese mit Actinomycin D keine Hemmung des Mitogen-induzierten Aminosäure-Einbaus in Proteine (47, 138). Bei GRANGER (38) verminderte die Blockierung der

RNS-Synthese mit Actinomycin D nicht die frühe Lymphotoxin-Bildung. Beobachtungen über 12 - 24 Stunden konnte er wegen der toxischen Wirkung des Hemmstoffs nicht durchführen. Auf die Bildung anderer Lymphokine wie MIF und MAF soll Actinomycin D nur während der ersten 4 - 5 Stunden nach Stimulation eine hemmende Wirkung haben (127). Spätere Zugabe des Inhibitors ließ die Bildung dieser beiden Faktoren unbeeinflusst. Die Autoren nahmen daher an, daß die Synthese der betreffenden mRNA nach dieser Zeit abgeschlossen war (127).

Mit Actinomycin D konnten wir in Einklang mit anderen Quellen (60) die induzierte Lymphozyten-DNS-Synthese völlig blockieren. Dagegen ließ sich die Lymphotoxin-Bildung mit Actinomycin D nicht vollständig hemmen (siehe 2a).

Mit Actinomycin D in Konzentrationen, die alle zugleich eine vollständige Hemmung der DNS-Synthese bewirkten, untersuchten wir in Kinetikstudien, ob eine RNS-Synthese prinzipiell für die Lymphotoxin-Bildung oder nur während einer bestimmten Zeit des Zellzyklus notwendig ist. Korrekterweise hätte als Kriterium für die Actinomycin D-Dosis die Blockade der RNS-Synthese bestimmt werden müssen; aus technischen Gründen begnügten wir uns mit der Bestimmung der DNS-Synthese. Im übrigen liegen unsere Dosen von Actinomycin D exakt in dem in der Literatur als wirksam angegebenen Bereich.

Eine kurze (1/2-stündige) Vorinkubation mit Actinomycin D der Lymphozyten vor Mitogenzugabe beeinflusste die Lymphotoxin-Bildung während der ersten 25 Stunden nicht - wobei die Lymphotoxin-Aktivität im zellfreien Medium und im Lysat bestimmt wurde - die späte Lymphotoxin-Bildung blieb im Vergleich zur Kontrollkultur jedoch unter der 50 %-Grenze. Vorinkubation für 1 - 2 Stunden blockierte die gesamte Lymphotoxin-Bildung. Bei gleichzeitiger Zugabe von Mitogen und Hemmstoff wurde die Lymphotoxin-Bildung abhängig von der Inkubationsdauer verringert; nach 4 - 6 Stunden Actinomycin D bildeten die Zellen nur noch 30 % Lymphotoxin. Kam Actinomycin D nach Vorstimu-

lation der Zellen während der 1. bis 7. Stunde für jeweils weitere sechs Stunden auf die Lymphozyten, so war danach jede weitere Lymphotoxin-Bildung blockiert. Wurde in einer anderen Versuchsserie den stimulierten Lymphozyten zu einem beliebigen Zeitpunkt der Lymphotoxin-Bildung Actinomycin D zugegeben und bis zum 3. Tag auf den Kulturen belassen, so nahm vom Zeitpunkt der Zugabe an die Lymphotoxin-Aktivität nicht mehr zu.

Bei konstanter Actinomycin D-Konzentration ist das Ausmaß der Inhibitorwirkung abhängig von seiner Einwirkungsdauer. Der Zeitpunkt der Zugabe von Actinomycin D in Bezug auf die Stimulation - d.h. vor, zugleich und nach Stimulationsbeginn - spielt eine wesentliche Rolle. Nach erfolgter Stimulation sind die Lymphozyten für den Hemmstoff besonders empfindlich. Actinomycin D zugleich mit dem Mitogen zugegeben zeigt auf die Lymphotoxin-Bildung keine so starke Wirkung. Für die Bildung von Lymphotoxin ist eine durch Actinomycin D hemmbare Neusynthese von RNS nötig. Ob für die Bildung des "frühen" Lymphotoxins eine pre-mRNS, mRNS in inaktiver Form oder sogar inaktives, an die Zellmembran gebundenes Lymphotoxin selbst (50, 51, 55, 57) vorliegt, kann mit den Ergebnissen aus Versuch Kap. 4.3.2 verneint werden.

Eine Steigerung der Lymphotoxin-Bildung durch Actinomycin D im Sinne der bei der Interferon-Synthese beschriebenen "Superinduktion" (48, 117, 123) konnten wir nach Vorinkubation der Lymphozyten mit dem Hemmstoff nicht nachweisen.

5.3 Lymphotoxin-Bildung bei Blockierung der Proteinsynthese

Die erste Lymphotoxin-Sekretion nach Mitogenstimulation erfolgt wenige Minuten danach (26, 87), sodaß sich die Frage ergibt, ob dieses Lymphotoxin von einer Proteinbiosynthese abhängig ist oder die Zelle einen "Lymphotoxin-Vorrat" (55) besitzt, den sie bei Bedarf nur noch ausschleusen muß.

GRANGER (38) beschreibt ohne nähere Konzentrationsangaben eine Hemmung der Lymphotoxin-Sekretion durch Puromycin und Cycloheximid. In einer neueren Arbeit (127) wird für die Bildung

zweier anderer Lymphokine MIF und MAF die Abhängigkeit von der Proteinbiosynthese differenziert dargestellt. Danach ist nach reversibler Hemmung der Proteinsynthese durch Cycloheximid und Puromycin während der ersten beiden Stunden nach Stimulation jede weitere Bildung von MIF und MAF blockiert. Da bei gleicher Prozedur zu einem späteren Zeitpunkt nach Stimulation diese Wirkung nicht zu beobachten ist, nimmt man die Bildung eines für diese Lymphokine wichtigen Schlüsselenzyms "Costimulator" an (57). Bleiben die Inhibitoren während der gesamten Stimulationsdauer in der Kultur, so unterbleibt die Bildung der beiden Faktoren, woraus die Autoren die Notwendigkeit einer kontinuierlichen Proteinsynthese für die Bildung von MIF und MAF postulieren. HISERODT et al. (55) fanden, daß ein bereits einmal aktivierter (preactivated) Lymphozyt einen hohen Gehalt sowohl an vorgeformten, intrazellulären als auch an membrangebundenen Lymphotoxin hat, und daß die Freisetzung dieses Lymphotoxins in das umgebende Medium unabhängig von einer Proteinsynthese oder von klassischen Sekretionsmechanismen geschehen kann.

Mit den drei Hemmstoffen der zytoplasmatischen Proteinsynthese Puromycin, Cycloheximid und Emetin und dem Hemmstoff der mitochondrialen Proteinsynthese Chloramphenicol untersuchten wir die Abhängigkeit der Lymphotoxin-Bildung von einer intakten Proteinsynthese.

In Dosiswirkungsstudien konnten wir mit 0,06 und 0,6 µg Cycloheximid/ml die Lymphotoxin-Bildung um 94 - 99 %, mit $1,1 \times 10^{-3}$ und $1,1 \times 10^{-2}$ mM Emetin um 93 - 94 % und mit 0,6 und 6 µg Puromycin/ml um 95 % hemmen. Alle drei Stoffe führten in diesen Konzentrationen gleichzeitig zu einer völligen Blockade der Mitogen-induzierten Lymphoproliferation (siehe auch 2a). Obwohl die drei Inhibitoren teils gleiche, teils unterschiedliche Schritte der Translation blockieren, unterschied sich ihre hemmende Wirkung auf die beiden bestimmten Parameter nicht.

Wurde Emetin und Cycloheximid in diesen Konzentrationen zugleich mit Stimulationsbeginn oder zu einem beliebigen Zeit-

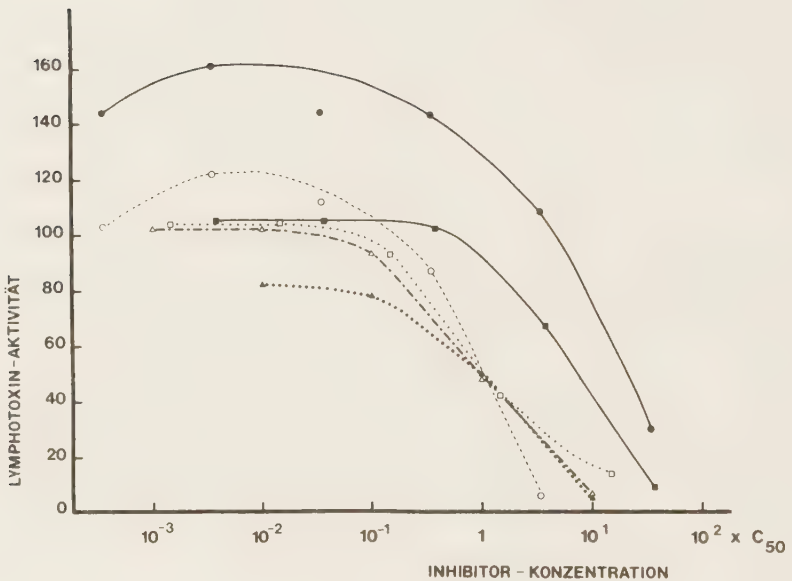


Abb. 5.5.3: Die Wirkung von Stoffwechsellinhibitoren auf die Lymphotoxin-Bildung

Ordinate: Lymphotoxin-Bildung in Einheiten (s. Kap. 3.8);

Abszisse: Konzentration der Stoffwechsellinhibitoren als lg der Konzentration, die zu einer 50 %-igen Hemmung der relevanten Makromolekülsynthese (für Emetin, Puromycin, Cycloheximid und Actinomycin D die Proteinsynthese, für Mitomycin C und Hydroxyurea die DNS-Synthese) führte. Die Aktivität der (Kontroll-) Kulturen ohne Hemmstoff betrug in jedem Versuchsansatz definitionsgemäß 100 %. Höhere Aktivitäten sind durch die Kurvenabschnitte dargestellt, die die 100 %-Grenze überschreiten.

- Mitomycin C
- Hydroxyurea
- Emetin
- Actinomycin D
- △—△ Cycloheximid
- ▲.....▲ Puromycin

Jeder Punkt gibt den Mittelwert von Dreifachbestimmungen an.

punkt danach zugegeben, so wurde bei Emetin sofort, bei Cycloheximid etwas verzögert jede weitere Lymphotoxin-Bildung gehemmt. Daraus müssen wir eine für die Lymphotoxin-Bildung während der gesamten Stimulationsdauer und zu allen Zeiten gleichermaßen notwendige Kontinuität der Proteinsynthese annehmen.

Da die Hemmstoffe nach Zugabe jedoch in allen Versuchen bis zur Ernte der Lymphotoxin-haltigen Überstände verblieben, können wir keine Aussage über eine besonders kritische bzw. wichtige Phase der Proteinsynthese im Sinne z.B. eines "Schlüsselenzyms" für die Lymphotoxin-Bildung machen (127).

Eine mitochondriale Proteinsynthese scheint für die Lymphotoxin-Bildung nicht erforderlich zu sein. Nur in toxischen Dosen von Chloramphenicol beobachteten wir sowohl eine Hemmung der Lymphoproliferation als auch der Lymphotoxin-Bildung. Einen Einfluß von Chloramphenicol auf die Lymphotoxin-Synthese wie er für die Antikörper-Bildung (1) beobachtet wurde, können wir nicht bestätigen.

5.4 Lymphotoxin-Freisetzung nach Blockierung des Sekretionsmechanismus

Cytochalasin B hemmt reversibel die Mikrofilamentenaktivität und den Membranstoffwechsel. Zusätzlich ist es ein kompetitiver Hemmstoff des Glucose-Transportmechanismus. Neben seiner hemmenden Wirkung auf die Lymphotoxin-Sekretion beeinflusst es auch die Mitogen-induzierte Lymphoproliferation. Der Effekt auf die Lymphoproliferation ist abhängig von der Cytochalasin B-Konzentration, der Mitogendosis und von dem Zeitpunkt der Zugabe des Hemmstoffs. In niedrigen Konzentrationen und wenn es mehr als 6 Stunden nach Stimulation der Kultur zugegeben wird, kann Cytochalasin B die Lymphoproliferation auch stimulieren (57).

ROSENAU et al. (102) beschreiben ohne nähere Angaben zur Dosis die Hemmung der Lymphotoxin-Sekretion durch Cytochalasin B. KRAMER und GRANGER (66) fanden, daß die Lymphotoxin-Sekretion ein aktiver Membranprozeß ist. Mit 10 µg Cytochalasin B/ml hemmten sie außer der Lymphotoxin-Freisetzung auch DNS-Synthese der Zellen. HISERODT et al. (55) zeigten, daß durch Cytochalasin B (1 µg/ml) die Lymphotoxin-Sekretion in primär Lektin-stimulierten, jedoch nicht in sekundär stimulierten Lymphozyten gehemmt wird. Daraus folgerten die Autoren, daß nach Stimulation Lymphotoxin intrazellulär und in membrangebundener Form vorhanden ist, welches bei Re-Stimulation ohne aktiven Sekretionsmechanismus freigesetzt werden kann.

Unter unseren Versuchsbedingungen konnten wir bei gleichzeitiger Zugabe von Mitogen und Cytochalasin B zu den Lymphozyten die Lymphotoxin-Sekretion mit 0,6 und 6 µg des Hemmstoffs pro ml blockieren. 0,6 µg Cytochalasin B/ml hemmten auch die Lymphoproliferation (genaueres siehe 2a).

5.5 Interferenz von Lymphotoxin und Stoffwechsellinhibitoren im DNS-Synthese-Hemmtest

Durch gleichzeitige Zugabe von Lymphotoxin und den Stoffwechsellinhibitoren auf die Indikatorzell-Kulturen untersuchten wir den Einfluß dieser Substanzen auf die zytotoxische Wirkung von Lymphotoxin im DNS-Synthese-Hemmtest.

SPOFFORD et al. (114) inkubierten HeLa-Zellen für 24 Stunden mit 0,5 µg Mitomycin C/ml, wuschen sie anschließend, resuspendierten sie in frischem Medium und gaben ihnen dann Lymphotoxin zu. Auf diese Weise erhielten sie für Lymphotoxin einen hochsensiblen Test. Die Teilung der Indikatorzellen war durch die Vorinkubation mit Mitomycin C unterbunden; eine Proliferation fand nicht mehr statt. Andere Autoren (134) verwenden zur Auswertung von Lymphotoxin mit Actinomycin D vorinkubierte L-Zellen. Wie bereits in Kap. 1.2.3 erwähnt, läßt sich durch gleich-

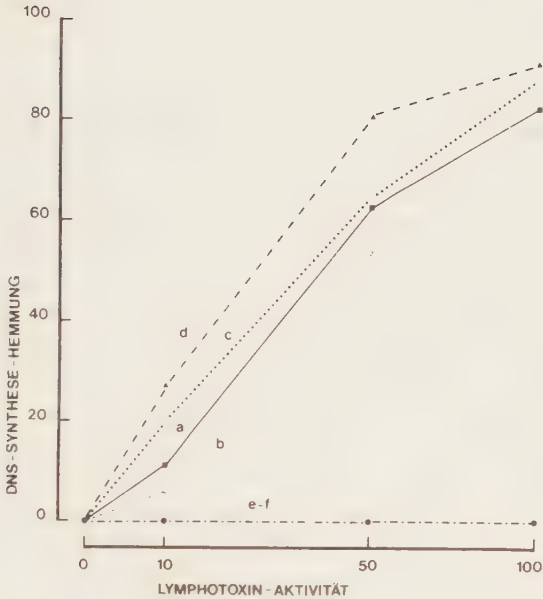


Abb. 5.5.1: Hemmung der HeLa-DNS-Synthese durch Lymphotoxin in Anwesenheit steigender Puromycin-Konzentrationen

Abszisse: Einheiten Lymphotoxin zugegeben zu HeLa-Zellkulturen

Ordinate: Hemmung (in Prozent) der HeLa-DNS-Synthese (3H-Thymin-Aufnahme bezogen auf die jeweilige Kontrollkultur ohne Lymphotoxin).

Die Kurven a - f entsprechen Kulturen:

- a) ohne Puromycin;
- b) mit $2 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ Puromycin/ml;
- c) mit $2 \times 10^{-3} \mu\text{g}$ Puromycin/ml;
- d) mit $2 \times 10^{-2} \mu\text{g}$ Puromycin/ml;
- e) mit $2 \times 10^{-1} \mu\text{g}$ Puromycin/ml;
- f) mit $2 \mu\text{g}$ Puromycin/ml.

Jeder Punkt gibt den Mittelwert von Dreifachbestimmungen an.

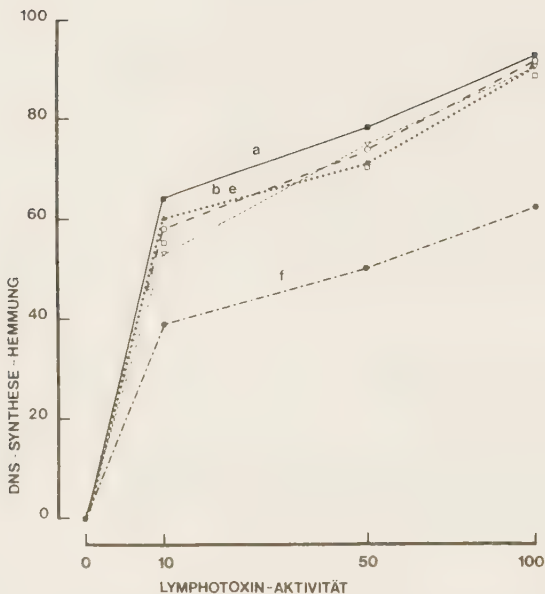


Abb. 5.5.2: Hemmung der HeLa-DNS-Synthese durch Lymphotoxin in Anwesenheit steigender Actinomycin D-Dosen

Abszisse: Einheiten Lymphotoxin zugegeben zu HeLa-Zellkulturen

Ordinate: Hemmung (in Prozent) der HeLa-DNS-Synthese (3H-Thymidin-Aufnahme) bezogen auf die jeweilige Kontrollkultur ohne Lymphotoxin.

Die Kurven a - f entsprechen Kulturen:

- a) ohne Actinomycin D
- b-e) mit 2×10^{-5} bis 2×10^{-2} µg Actinomycin D/ml;
- f) mit 2×10^{-1} µg Actinomycin D/ml.

Jeder Punkt gibt den Mittelwert von Dreifachbestimmungen an.

zeitige Inkubation - nicht Vorinkubation - mit Actinomycin D (104), Puromycin (140) und Cycloheximid (140) die zytotoxische Wirkung von Lymphotoxin auf die Indikatorzellen verstärken.

Bei uns ließen alle Inhibitoren - außer Puromycin - die Zytotoxizität von Lymphotoxin im DNS-Synthese-Hemmtest in niedrigen Konzentrationen unbeeinflußt. In hohen Dosen hemmten sie die HeLa-Zell-DNS-Synthese so stark, daß die zytotoxische Wirkung von Lymphotoxin auf die HeLa-Zellen nicht mehr beurteilt werden konnte. Zusammen mit 2×10^{-2} und 2×10^{-3} µg Puromycin/ml und Lymphotoxin fanden wir eine mäßige Verstärkung der zytotoxischen Wirkung auf die Indikatorzellen (Abb. 5.5.1). Eine Steigerung der Sensibilität der HeLa-Zellen gegenüber Lymphotoxin in Anwesenheit von Actinomycin D (Abb. 5.5.2) und Cycloheximid (siehe 2a) fanden wir nicht. Die gleichzeitige Inkubation der HeLa-Zellen mit Lymphotoxin und Mitomycin C oder Actinomycin D hatten nicht denselben Effekt wie eine Vorinkubation mit diesen Stoffen (Abb. 4.1.3 und Abb. 5.5.2).

6 Zusammenfassung

Lymphotoxin ist ein Produkt polyklonal aktivierter Lymphozyten. Sehr wirksame Induktoren der Lymphotoxin-Synthese sind die Mitogene Phytohämagglutinin und Concanavalin A.

In dieser Arbeit wurde der Mechanismus der intrazellulären Lymphotoxin-Bildung genauer untersucht: Um die Abhängigkeit der Lymphotoxin-Bildung von der DNS-, RNS- und Protein-Synthese und die Kinetik der Lymphotoxin-Freisetzung zu prüfen, wurde der Einfluß von Hemmstoffen der DNS-, RNS- und Protein-Synthese auf die Lymphotoxin-Bildung ermittelt.

Die Untersuchungen wurden mit Human-Lymphozyten gesunder Probanden durchgeführt. In Dosis-Wirkungsstudien wurden zunächst die jeweils wirksamen Dosen der Präparate Mitomycin C, Hydroxyurea, Actinomycin D, Cycloheximid, Puromycin, Emetin, Chloramphenicol und Cytochalasin B ermittelt (siehe auch 2a). In Kinetik-Studien wurde die Lymphotoxin-Synthese in Lymphozyten nach erfolgter Stimulation zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation mit den Hemmstoffen blockiert; in weiteren Ansätzen wurde der Einfluß der Hemmstoffe auf die Lymphotoxin-Synthese nach Vorinkubation bzw. bei gleichzeitiger Zugabe mit dem Mitogen ermittelt.

Aus den Ergebnissen dieser Studie können wir schließen, daß die Bildung und Sekretion von Lymphotoxin eine intakte Protein-Synthese voraussetzt; hierbei handelt es sich um eine zytoplasmatische jedoch nicht um eine mitochondriale Protein-Bildung. Der Lymphozyt verfügt für die Lymphotoxin-Bildung über keinen mRNS-Pool. Für die Synthese von Lymphotoxin ist eine Neusynthese von RNS notwendig. Die Hemmung der DNS-Synthese hat keinen direkten Einfluß auf die Lymphotoxin-Bildung. Eine frühe, proliferationsunabhängige basale Lymphotoxin-Bildung ist möglich; für eine maximale Lymphotoxin-Bildung ist jedoch die Proliferation der stimulierten Lymphozyten notwendig. Ähnlich wie beim "Superinduktionsphänomen" der Interferonbildung, läßt sich die Lymphotoxin-Bildung durch niedrige Dosen eines DNS-Synthese-Hemmstoffes (Mitomycin C) potenzieren.

7 Literaturverzeichnis

- (1) AMBROSE, C.T. and COONS, A.H.:
Studies on antibody production. VIII. The inhibitory effect of chloramphenicol on the synthesis of antibody in tissue culture.
J. Exp. Med. 117: 1075-1088, 1963
- (2) AMINO, N., LINN, E.S., PYSHER, I.J., MIER, R., MOORE, G.E., DEGROOT, I.J.:
Human lymphotoxin obtained from established lymphoid cell lines: Purification characteristics and inhibition by antiimmunoglobulin.
J. Immunol. 113: 1334-1345, 1974
- (2a) BEAUCAMP, T.:
Untersuchungen zur Biosynthese von Lymphotoxin.
Dissertationsschrift, München, 1982
- (3) BLOOM, B.R., STONER, G., GAFFNEY, J., SKEVACH, E., GREEN, I.:
Production of migration inhibitory factor and lymphotoxin by non-T-cells.
Eur. J. Immunol. 5: 218-220; 1975
- (4) BOULOS, G.N., ROSENAU, W., GOLDBERG, M.L.:
Comparison and yield of antigen- or mitogen-induced human lymphotoxins.
J. Immunol. 112: 1347-1353, 1974
- (5) BOWMAN, W.C. and RAND, M.J. (eds.):
Textbook of pharmacology.
Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1980
- (6) BOYCE, R.P. and HOWARD-FLANDERS, P.:
Genetic control of DNA breakdown and repair in E. coli K-12 treated with mitomycin C or ultraviolet light.
Z. Vererbungslehre 95: 345-354, 1964
- (7) CHAKRABARTI, S., DUBE, K., ROY, S.C.:
Effects of emetine and cycloheximide on mitochondrial protein synthesis in different systems.
Biochem. J. 128: 461-462, 1972
- (8) COLES, N.N. and GROSS, R.:
The effect of mitomycin C on the induced synthesis of penicillinase in staphylococcus aureus.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 20: 366-371, 1965
- (9) COOPER, H.L.:
Ribosome utilization and regulation of protein synthesis during lymphocyte activation. In: Regulatory Mechanism in Lymphocyte Activation, Proc. 11th Leuk. Cult. Conf., Lucas, D.O. (ed.), Academic Press, New York, p.94, 1977

- (10) CRAIG, N.:
The effects of inhibitors of RNA and DNA synthesis on protein synthesis and polysome levels in mouse L-cells. J. Cell. Physiol. 82: 133-150, 1973
- (11) DAS, H.K., GOLDSTEIN, A., KANNEP, L.C.:
Inhibition by chloramphenicol of the growth of nascent protein chains in E. coli. Mol. Pharmacol. 2: 158-170, 1966
- (12) DAYNES, R.A. and GPANGER, G.A.:
The regulation of lymphotoxin release from stimulated human lymphocyte cultures: The requirement for continual mitogen stimulation. Cell. Immunol. 12: 252-262, 1974
- (13) DORIAN, R., BERNHEIM, J.L., MENDELSON, J.:
Quantification of entry into and exit from cell cycle in human lymphocyte cultures. Cell. Tiss. Kinet. 11: 33-41, 1978
- (14) EHRLICH, J., LARTH, Q.R., SMITH, R.M., JOSLYN, D.A., LURKHOLDER, P.R.:
Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete. Science 106: 417-420, 1947
- (15) EIFE, R.:
Klinische und experimentelle Untersuchungen über Lymphotoxin. Habilitationsschrift, München, 1980
- (16) EIFE, R., EDELBLUT, C., HERRLICH, P.:
Manuskript in Vorbereitung
- (17) EIFE, R., EIFE, G., AUGUST, C., KUHRE, W., STAEHR-JOHANSEN, K.:
Lymphotoxin production and blast cell transformation by cord blood lymphocytes: Dissociated functions in newborn infants. Cell. Immunol. 14: 435-442, 1974
- (18) EIFE, G., EIFE, R., BRENDEN, W.:
The effect of antilymphocyte globulin (ALG) on human lymphocytes in vitro: Inhibition of lymphotoxin production as a sensitive indicator for ALG activity. Cell. Immunol. 46: 35-47, 1979
- (19) EIFE, R. and AUGUST, C.:
Detection of lymphotoxin produced in mixed lymphocyte cultures (MLC): Variation of target cell sensitivity. Cell. Immunol. 9: 163-168, 1973

- (20) FAIR, D.S., JEFFES, E.W.E., WARE, C.F., GRANGER, G.A.:
The PGLC-33H cell line appears to secrete only -
lymphotoxin.
Cell. Immunol. 26: 355, 1976
- (21) FALCOFF, R.M. and DUTTON, R.W.:
Evidence that Con A induced cytotoxicity in the same
subclass of T cells as does alloimmunization.
J. Immunol. 118: 1600-1606, 1977
- (22) FLESSEL, C.P.:
Chloramphenicol protects polyribosomes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 32: 438-446, 1968
- (23) FRAENKEL, D.G. and NEIDHARDT, F.C.:
Use of chloramphenicol to study control of RNA syn-
thesis in bacteria.
Biochim. Biophys. Acta 53: 96-110, 1961
- (24) FRENKEL, E.P., SKINNER, W.N., SMILEY, J.D.:
Studies on the metabolic defect induced by hydroxyurea.
Cancer Chemotherapy Rept. 40: 19-22, 1964
- (25) FRIEND, D.S. and ROSENAU, W.:
Target-cell membrane alterations induced by lympho-
toxin (Ultrastructural observations).
Am. J. Path. 86: 149-162, 1977
- (26) FUDENBERG, H.H., STITES, D.P., CALDWELL, J.L., WELLS, J.V.
(eds.):
Basic & Clinical Immunology, Lange Medical Publica-
tions, Los Altos, California, 1980
- (27) GALE, E.F. and FOLKES, J.P.:
The assimilation of amino-acids by bacteria.
15. Actions of antibiotics on nucleic acid and protein
synthesis in staphylococcus aureus.
Biochem. J. 53: 493-498, 1953
- (28) CALE, E.F., CUNDLIFFE, E., REYNOLDS, P.E., RICHMOND, M.H.,
WARING, J.J.:
Antibiotic inhibitors of ribosome function
In: The molecular basis of antibiotic action
John Wiley & Sons (eds.), London, pp. 325-332, 1972
- (29) GALIEP, J.B. and DAFNELL, J.E.:
Mitochondrial protein synthesis in HeLa cells.
J. Mol. Biol. 57: 363-367, 1971
- (30) CATELY, M.K. and MAYER, M.M.:
The effect of antibodies to complements C₂, C₃ and C₅
on the production and action of lymphotoxin.
J. Immunol. 109: 728-734, 1972

- (31) GILEAD, Z. and BECKER, Y.:
Effect of emetine on ribonucleic acid biosynthesis in HeLa cells.
Eur. J. Biochem. 23: 143-149, 1971
- (32) GODCHAUX, W. and HERREPT, E.:
The effect of chloramphenicol in intact erythroid cells.
J. Mol. Biol. 21: 537-553, 1966
- (33) GOODMAN, L.S. and GILMAN, A. (eds.)
The Pharmacologic Basis of Therapeutics
5th Edition, p. 1294, 1975
- (34) GRANGER, G.A. and KOLE, W.P.:
Lymphocyte in vitro cytotoxicity: Mechanism of immune and non-immune small lymphocytes mediated target L-cell destruction.
J. Immunol. 101: 111-120, 1968
- (35) GRANGER, G.A., MOORE, G.E., WHITE, J.G., MATZINGER, P., SUNDSTROM, J.S., SHUPE, S., KOLB, W.P., KRAMER, J., GLADE, P.R.:
Production of lymphotoxin and migration inhibitory factor by established human lymphocytic cell lines.
J. Immunol. 104: 1476-1485, 1970
- (36) GRANGER, G.A. and WILLIAMS, T.V.:
Lymphocyte cytotoxicity in vitro: Activation and release of a cytotoxic factor.
Nature 218: 1253-1254, 1968
- (37) GRANGER, G.A., YAMAMOTO, R.S., FAIR, D.S., HISERODT, J.C.:
The Human LT System: I. Physical-chemical heterogeneity of LT molecules released by mitogen activated human lymphocytes in vitro.
Cell. Immunol. 38: 388-402, 1978
- (38) GRANGER, G.A.:
Mechanism of lymphocyte-induced cell and tissue destruction in vitro.
Am. J. Path. 60: 469-481, 1970
- (39) GROLLMAN, A.P. and HUANG, M.T.:
Inhibitors of protein synthesis in eukaryotes: Tools in cell research.
Federation. Proc. 32: 1673-1678, 1973
- (40) GROLLMAN, A.P.:
Inhibitors of protein biosynthesis: V. Effects of emetine on protein and nucleic acid biosynthesis in HeLa cells.
J. Biol. Chem. 243: 4089-4094, 1968

- (41) GROLLMAN, A.P.:
Structural basis for inhibition of protein synthesis
by emetine and cycloheximide based on analogy between
alkaloids and glutarimide antibiotics.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56: 1867-1874, 1968
- (42) GROLLMAN, A.P. and JARKOVSKY, Z.:
Emetine and related alkaloids.
In: Mechanism of action of antimicrobial and anti-
tumor agents.
Antibiotics III, Corcorau, J.W. and Hahn, F.E. (eds.),
Springer Verlag, Heidelberg, pp. 420-435, 1975
- (43) GURGO, C., APIRION, D., SCHLESSINGER, D.:
Effects of chloramphenicol and fusidic acid on poly-
ribosome metabolism in *E. coli*.
FEBS Letters 3: 34-46, 1969
- (44) GURGO, C., APIRION, D., SCHLESSINGER, D.:
Polyribosome metabolism in *E. coli* treated with chlor-
amphenicol, neomycin, spectinomycin or tetracycline.
J. Mol. Biol. 45: 205-220, 1969
- (45) HAHN, F.E.:
Chloramphenicol
In: Mechanism of Action
Antibiotics I, Gottfried, D. and Shaw, P.D. (eds.),
Springer Verlag, Berlin, pp. 308-330, 1967
- (46) HARRIS, G. and OLSEN, I.:
Cell division and deoxyribonucleic acid (DNA) synthesis
in cultures of stimulated lymphocytes.
J. Immunol. 31: 195-204, 1976
- (47) HAUSER, H., KNIPPERS, R., SCHÄFER, K.P.:
Increased rate of RNA polyadenylation. An early response
in concanavalin A activated lymphocytes.
Exp. Cell. Res. 111: 175-184, 1978
- (48) HAVELL, E.A. and VILCEK, J.:
Production of high titered interferon in cultures of
human diploid cells.
Antimicrob. Agents Chemother. 2: 476-484, 1972
- (49) HIRAMINE, C. and HOJO, K.:
Effects of inhibitors of DNA and protein synthesis
on mitogenic factor production by PDD-stimulated
guinea pig lymphocytes.
Tohoku J. Exp. Med. 119: 325-332, 1976

- (50) HISERODT, J.C., WARE, C.F., HARRIS, P.C., GRANGER, G.A.:
Identification of membrane associated lymphotoxin
on mitogen-activated human lymphocytes using hetero-
logous anti-LT sera in vitro.
Cell. Immunol. 34: 325-339, 1977
- (51) HISERODT, J.C., YAMAMOTO, R.S., GRANGER, G.A.:
The Human LT-System: III. Characterisation of a
high molecular weight LT class (Complex) composed
of the various smaller MW LT classes and subclasses
in association with Ig-like molecules.
Cell. Immunol. 38: 417-433, 1978
- (52) HISERODT, J.C., YAMAMOTO, R.S., GRANGER, G.A.:
The Human LT-System: IV. Studies on the large MW
LT complex class: Association of these molecules
with specific antigen binding receptor(s) in vitro.
Cell. Immunol. 41: 380-396, 1978
- (53) HISERODT, J.C. and GRANGER, G.A.:
In vitro lymphocyte cytotoxicity: II. Unstable lympho-
toxins (β -LT) secreted and inactivated by mitogen-
stimulated human lymphocytes.
Cell. Immunol. 26: 211-216, 1976
- (54) HISERODT, J.C., PRIEUR, A.M., GRANGER, G.A.:
In vitro lymphocyte cytotoxicity: I. Evidence of mul-
tiple cytotoxic molecules secreted by mitogen activa-
ted human lymphoid cells in vitro.
Cell. Immunol. 24: 277-288, 1976
- (55) HISERODT, J.C., FORD, S.C., HARRIS, P.C., GRANGER, G.A.:
The Human LT System: VII. Release of soluble forms
and delivery to target L-929 cells by lectin-pre-
activated human lymphocytes in the absence of protein
synthesis and secretory processes.
Cell. Immunol. 47: 32-45, 1979
- (56) HISERODT, J.C., WARE, C.F., GRANGER, G.A.:
Identification of LT as the mediator of direct cyto-
lysis of L 929 cells by mitogen activated human
lymphocytes in vitro.
In: Regulatory Mechanisms in Lymphocyte Activation
Lucas, D.O. (ed.), Academic Press, New York,
pp. 551-553, 1977
77. HUME, D.A. and WEIDEMANN, M.J. (eds.):
Mitogenic lymphocyte transformation
Research monography in Immunology, Vol. 2
Elsevier/North Holland Biomedical Press,
Amsterdam, 1980

- (58) IYER, V.N. and SZYBIALSKI, W.:
A molecular mechanism of mitomycin action: Linking
of complementary DNA strands.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 50: 355-362, 1963
- (59) KAPLAN, J.C.:
Synthesis and processing of RNA in stimulated fibro-
blasts and lymphocytes.
In: Cell biology of leukocyte function
Quastel, M.R. (ed.), Academic Press, New York,
p. 87, 1979
- (60) KAY, J.E., LEVENTHAL, L.G., COOPER, H.L.:
Effects of inhibition of ribosomal RNA-synthesis on
the stimulation of lymphocytes by phytohemagglutinin.
Exp. Cell. Res. 54: 94-100, 1969
- (61) KERSTEN, H. and RAUEN, H.M.:
Degradation of deoxyribonucleic acid in E. coli cells
treated with mitomycin C.
Nature 190: 1195-1196, 1961
- (62) KERSTEN, H., KERSTEN, W., LEOPOLD, G., SCHNIEDERS, E.:
Effect of mitomycin C on DNase and RNA in E. coli.
Biochim. Biophys. Acta 80: 521-523, 1964
- (63) KERSTEN, H.:
Action of mitomycin C on nucleic acid metabolism in
tumor and bacterial cells.
Biochim. Biophys. Acta 55: 558-560, 1962
- (64) KOLB, W.P. and GRANGER, G.A.:
Lymphocyte in vitro cytotoxicity: Characterization
of human lymphotoxin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61: 1250-1255, 1968
- (65) KRAHOFF, J.H.:
Clinical and pharmacologic effects of hydroxyurea.
In: Antineoplastic and Immunosuppressive Agents,
Part II, Sartorelli, A.C. and Johns, D.G. (eds.),
Springer Verlag, Berlin, pp. 783-792, 1975
- (66) KRAMER, J.J. and GRANGER, G.A.:
Relationship of lymphotoxin secretion and DNA syn-
thesis in the human mixed lymphocyte reaction in
vitro.
Cell. Immunol. 17: 192-201, 1975

- (67) KRAMER, S.L. and GRANGER, G.A.:
The role of lymphotoxin in target cell destruction induced by mitogen-activated human lymphocytes in vitro. II. The correlation of temperature and Trypsin-sensitive phases of lymphotoxin-induced and lymphocyte-mediated cytotoxicity.
J. Immunol. 116: 562-567, 1976
- (68) KROON, A.M.:
Protein synthesis in heart mitochondria. I. Amino-acid incorporation into the protein of isolated beef-heart mitochondria and fractions derived from them by sonic oscillation.
Biophys. Acta 72: 391-402, 1963
- (69) KUNITOMI, G., ROSENAU, W., BURKE, G.C., GOLDBERG, M.L.:
Alterations in RNA synthesis in lymphotoxin-treated target cells.
Am J. Pathol. 80: 249-260, 1975
- (70) KURODA, Y. and FURUYAMA, J.:
Physiological and biochemical studies of effects of mitomycin C on strain HeLa cells in cell culture.
Cancer Res. 23: 682-687, 1963
- (71) LAWRENCE, S.H. and LANDY, M. (eds.):
Mediators of cellular immunity.
Academic Press, London, 1969
- (72) LEE, S.C. and LUCAS, Z.J.:
Regulatory factors produced by lymphocytes: I. The occurrence of multiple α -lymphotoxins associated with ribonuclease activity.
J. Immunol. 117: 283-290, 1976
- (73) LEOPOLD, G., SCHNIEDERS, B., KERSTEN, H., KERSTEN, W.:
The effect of mitomycin C on ribosomes and soluble ribonucleic acid in E. coli.
Biochem. Zeitschrift 343: 423-432, 1965
- (74) LERMAN, M.I. and BENJUMOVIC, M.S.:
Effect of mitomycin C on protein synthesis in human neoplastic cell lines.
Nature 206: 1231-1232, 1965
- (75) LESSARD, J.L. and PESTKA, S.:
Studies on the formation of transfer ribonucleic acid-ribosomes complexes. XXIII. Chloramphenicol, aminoacyl oligonucleotides, and E. coli ribosomes.
J. Biol. Chem. 247: 6909-6912, 1972
- (76) LIEBERMANN, M.W., SELL, S., FARBER, E.:
Deoxyribonucleoside incorporation and the role of hydroxyurea in a model lymphocyte system for studying.
Cancer Res. 31: 1307-1312, 1971

- (77) LIES, R.E.:
Cytotoxin ("Lymphotoxin") mediated target cell lysis:
Involvement of surface component.
Cell. Immunol. 17: 96-105, 1975
- (78) LIES, R.E.:
Requirement for serum component in cytotoxin ("Lymphotoxin")-mediated target cell lysis.
Cell. Immunol. 14: 155-159, 1974
- (79) LIETMAN, P.S.:
Mitochondrial protein synthesis: Inhibition by emetine hydrochloride.
Mol. Pharm. 7: 122-128, 1970
- (80) LINDAHL-KIESSLING, K. and PETERSON, R.D.A.:
The mechanism of phytohemagglutinin action. I. Mouse spleen cells in short-term culture. The effect of neonatal exposure to phytohemagglutinin.
Exp. Cell. Res. 54: 231-236, 1969
- (81) LIPSETT, M.N. and WEISSBACH, A.:
The site of alkylation of nucleic acids by mitomycins.
Biochemistry 4: 206-211, 1965
- (82) LUCAS, D.O. and KLIMPEL, G.:
Parameters of lymphocyte activation.
In: Regulatory mechanisms in lymphocyte activation.
Lucas, D.O. (ed.), Proc. 11th Leuk. Cult. Conf.
Academic Press, New York, p. 76, 1977
- (83) McCUBE, J.M., HUMPHREYS, R.E., YOCUM, R.R., STROMINGER, J.L.:
Enhanced representation of HL-A antigens on human lymphocytes after mitogenesis induced by PHA or Epstein-Barr virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3206-3209, 1975
- (84) MCGRECOR, D.D. and LOGIE, P.S.:
Mediator of cellular immunity: VIII. Effects of mitomycin C on specifically sensitized lymphocytes.
Cell. Immunol. 15: 69-81, 1975
- (85) MITCHELL, M., BARD, E., L'ANGLAIS, R., KAPLAN, J.G.:
Transport of RNA from nucleus to cytoplasm following mitogenic stimulation of human lymphocytes.
Can. J. Biochem. 56: 659-664, 1978
- (86) NAKATA, Y., NAKATA, K., SAKAMOTO, Y.:
On the action mechanism of mitomycin C.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 6: 339-343, 1961

- (87) NASPITZ, C.K. and RICHTER, M.:
The action of phytohemagglutinin in vivo and in vitro, a review.
Progr. Allergy 12: 1-85, 1968
- (88) NIRENBERG, M.W. and MATHAEI, J.H.:
The dependence of cell-free protein synthesis in E.coli upon naturally occurring or synthetic poly-ribonucleotides.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 47: 1588-1602, 1961
- (89) OKAMOTO, M. and MAYER, M.M.:
Studies on the mechanism of action of guinea pig lymphotoxin. II. Increase of calcium uptake rate in LT-damaged target cells.
J. Immunol. 120: 272-285, 1978
- (90) OLEINICK, N.L.:
Initiation and elongation of protein synthesis in growing cells. Differential inhibition by cycloheximide and emetine.
Arch. Biochem. 182: 171-180, 1977
- (91) OPPENHEIM, J.J.:
Relationship of in vitro lymphocyte transformation to delayed hypersensitivity in guinea pig and man.
Fed. Proc. 27: 21-28, 1968
- (92) PARDEE, A.B. and PRESTIDGE, L.S.:
The dependence of nucleic acid synthesis on the presence of amino acids in E.coli.
J. Bacteriol. 71: 677-683, 1956
- (93) PERSSON, U., BICK, P.H., HAMMASTRÖM, L., MÖLLER, E., SMITH, C.I.E.:
Different requirements for T cells responding to various doses of concanavalin A.
Scand. J. Immunol. 8: 291-301, 1978
- (94) PESTKA, S.:
Inhibitors of ribosome function.
Ann. Rev. Microbiol. 25: 487-503, 1971
- (95) PESTKA, S.:
Studies on the formation of transfer ribonucleic acid-ribosome complexes. VIII. Survey of the effect of antibiotics on N-acetyl-phenylalanyl-puromycin formation: Possible mechanism of chloramphenicol action.
Arch. Biochem. Biophys. 136: 80-88, 1970

- (96) PESTKA, S.:
Chloramphenicol
In: Mechanism of action of antimicrobial and antitumor
agents, Antibiotics III
Corcoran, J.W. and Hahn, F.E. (eds.), Springer-Verlag,
Heidelberg, pp. 370-395, 1975
- (97) PESTKA, S.:
Inhibitors of ribosome function.
Ann. Rev. Microbiol. 25: 487-562, 1971
- (98) PESTKA, S.:
Studies on the formation of transfer ribonucleic acid-
ribosomes complexes: IX. Effect of antibiotics on
translocation and peptide bond formation.
Arch. Biochem. Biophys. 136: 89-96, 1970
- (99) PFEIFFER, S.E. and TOMACH, L.J.:
Inhibition of DNA synthesis in HeLa cells by hydroxy-
urea.
Cancer Res. 27: 124-129, 1967
- (100) REICH, E., SHATKIN, A.J., TATUM, E.L.:
Bacteriological action of mitomycin C.
Biochim.Biophys.Acta 45: 608-610, 1960
- (101) REICH, E., SHATKIN, A.J., TAUM, E.L.:
Bacteriological action of mitomycin C.
Biochim.Biophys.Acta 53: 132-149, 1961
- (102) ROSENAU, W. and TSOUKAS, C.D.:
Lymphotoxin: A review and analysis.
Am. J. Path. 84: 580-596, 1976
- (103) ROSENAU, W., BURKE, G.C., ANDERSON, R.:
Effects of lymphotoxin on target-cell plasma-membrane
lipids.
Cell. Immunol. 60: 144-154, 1981
- (104) ROSENAU, W., GOLDBERG, M.L., BURKE, G.C.:
Early biochemical alterations induced by lymphotoxin
in target cells.
J. Immunol. 111: 1128-1135, 1973
- (105) RUDDLE, N.H. and WAKSMAN, B.H.:
Cytotoxicity mediated by soluble antigen and lympho-
cytes in delayed hypersensitivity. III. Analysis of
mechanism.
J. Exp. Med. 128: 1267-1280, 1968

- (106) RUSSEL, S.W., ROSENAU, W., LEE, J.C.:
Cytolysis induced by human lymphotoxin. Cinemicro-
graphic and electron microscopic observations.
Am. J. Path. 69: 103-112, 1972
- (107) SASYKIN, J.O.:
Mitomycin and DNS-Alkylierung
In: Antibiotika als Inhibitoren biochemischer
Prozesse.
P. Westermann (ed.), Akademie-Verlag, Berlin,
pp. 389-416, 1972
- (108) SHACKS, S.J. and GRANGER, G.A.:
Studies on in vitro models of cellular immunity.
J. Reticuloendothel. Soc. 10: 28-49, 1971
- (109) SHACKS, S.J., CHILLER, J., GRANGER, G.A.:
Studies on in vitro models of cellular immunity:
The role of T and B cells in the secretion of
lymphotoxin.
Cell. Immunol. 7: 313-321, 1973
- (110) SHARMA, O.K. and LOEB, L.A.:
Methylation of transfer RNA during transformation
of human lymphocytes by phytohemagglutinin.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 50: 172-181, 1973
- (111) SHATKIN, A.J., REICH, E., FRANKLIN, R.M., TATUM, E.L.:
Effect of mitomycin C on mammalian cells in culture.
Biochim.Biophys.Acta 55: 277-289, 1962
- (112) SINCLAIR, W.K.:
Hydroxyurea: Effects on Chinese hamster cells grown
in culture.
Cancer Res. 27: 297-308, 1967
- (113) SOBEL, J.S.:
Inhibitory effect of hydroxyurea on (3-H) leucine
incorporation in human peripheral lymphocytes.
Chem. Biol. Interact. 11: 33-39, 1975
- (114) SPOFFORD, E.T., DAYNES, R.A., GRANGER, G.A.:
Cell-mediated immunity in vitro: A highly sensitive
assay for human lymphotoxin.
J. Immunol. 112: 2111-2116, 1974
- (115) SMITH-KIELLAND, I.:
The effect of mitomycin C on ribonucleid acid
synthesis in growing cultures of E. coli.
Biochim.Biophys.Acta 119: 486-491, 1966

- (116) SMITH-KIELLAND, I.:
The effect of mitomycin C on deoxyribonucleic acid
and messenger ribonucleic acid in *E. coli*.
Biochim.Biophys.Acta 114: 254-263, 1966
- (117) STEWART, W.E. (ed.):
The Interferon System
Springer Verlag, Wien, 1979
- (118) STRAUSS, P.R., SHEEHAN, J.M., KASHKET, E.R.:
Membrane transport by murine lymphocytes. II. The
appearance of thymidine transport in cells from
concanavalin A-stimulated mice.
J. Immunol. 118: 1328- , 1977
- (119) STUDZINSKI, G.P. and COHEN, L.S.:
Mitomycin C induced increases in the activities of
the deoxyribonucleases of HeLa cells.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 23: 506-512, 1966
- (120) SUZUKI, H. and KILGAE, W.W.:
Mitomycin C: Effect on ribosomes of *E. coli*.
Science 146: 1585-1587, 1964
- (121) SZYBALSKI, W. and IYER, V.N.:
The mitomycins and porfiromycins
In: Mechanism of Action
Antibiotics I, D. Gottfried and Shaw, P.D. (eds.),
Springer Verlag, Heidelberg, pp. 211-245, 1967
- (122) SZYBALSKI, W. and IYER, V.N.:
Crosslinking of DNA by enzymatically or chemically
activated mitomycins and porfiromycins, bifunc-
tionally "alkylating" antibiotics.
Federat. Proc. 23: 946-957, 1964
- (123) TAN, Y.L., ARMSTRONG, J.A., KE, Y.M., HO, M.:
Regulation of cellular interferon production:
Enhancement antimetabolites.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67: 464-471, 1970
- (124) TERAWAKI, A. and GREENBERG, J.:
Post-treatment breakage of mitomycin C induced in
cross-links in deoxyribonucleic acid of *E. coli*.
Biochim.Biophys.Acta 119: 540-546, 1966
- (125) TSOUKAS, C.D., ROSENAU, W., FAXTER, J.D.:
Cellular receptors for lymphotoxin: Correlation
of binding and cytotoxicity in sensitive and
resistant target cells.
J. Immunol. 116: 184-187, 1976

- (126) TSOUKAS, C.D. and ROSENAU, W.:
Inhibition of lymphotoxin- and lymphocyte-mediated
cytolysis by high molecular-weight dextran.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 154: 215-218, 1977
- (127) VARESEO, L., HOLDEN, H.T., TARAMELLI, D.:
Mechanism of lymphocyte activation: II. Requirements
of macromolecular synthesis in the production of
lymphokines.
J. Immunol. 125: 2810-2817, 1980
- (128) VAZQUEZ, D.:
Inhibitors of protein synthesis at the ribosome level;
studies on their site of action.
Life Sci. 6: 381-386, 1967
- (129) VAZQUEZ, D.:
Antibiotics which affect protein synthesis: The uptake
of 14C-chloramphenicol by bacteria.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 12: 409-413, 1963
- (130) VAZQUEZ, D.:
Binding of chloramphenicol to ribosomes. The effect
of a number of antibiotics.
Biochim.Biophys.Acta 114: 277-288, 1966
- (131) VLCKOVA, L., VONDREIS, V., NECASEK, J.:
Interaction of emetine with DNA and its effect on
adsorption of certain bacteriophages.
Fol. Microb. 15: 76, 1970
- (132) WAKAKI, S., MARUMO, H., TOMIOKA, K., SHIMIZU, G., KATO, E.,
KAMADA, H., KUDO, S., FUJIMOTO, Y.:
Isolation of new fractions of antitumor mitomycins.
Antibiotics and Chemotherapy 8: 228-240, 1958
- (133) WALKER, S.M.:
Mitogen-activated lymphocytes elaborate two different
cytotoxins.
Fed. Proc. 34: 952, 1975
- (134) WALKER, S.M., LEE, S., LUCAS, Z.J.:
Cytotoxic activity of lymphocytes: VI. Heterogeneity
of cytotoxins in supernatants of mitogen-activated
lymphocytes.
J. Immunol. 116: 807-815, 1976
- (135) WALKER, S.M. and LUCAS, Z.J.:
Cytotoxic activity of lymphocytes: II. Studies on
Mechanism of lymphotoxin-mediated cytotoxicity.
J. Immunol. 109, 1233-1244, 1972

- (136) WATERFIELD, J.D., WATERFIELD, E.M., ANACLERIO, A.,
MÜLLER, G.:
Lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumour
cells. Specificity and characterization of concana-
valin A-activated cytotoxic effector lymphocytes.
Transplant. Rev. 29: 277-310, 1976
- (137) WEISSBACH, A. and LISIO, A.:
Alkylation of nucleic acids by mitomycin C and
porfiromycin.
Biochemistry 4: 196-200, 1965
- (138) WETTENHALL, R.E.H., SLOBEE, A., HIGGINS, T.J.V.:
Evidence for the presence of mRNA in the post
ribosomal cytoplasm of sheep lymphocytes.
Biochim.Biophys.Acta 432: 312-320, 1976
- (139) WILLIAMS, T.W. and GRANGER, G.A.:
Lymphocyte in vitro cytotoxicity: Correlation of
depression with release of lymphotoxin from human
lymphocytes.
J. Immunol. 103, 170-178, 1969
- (140) WILLIAMS, T.W. and GRANGER, G.A.:
Lymphocyte in vitro cytotoxicity: Mechanism of LT-
induced target cell destruction.
J. Immunol. 102, 911-918, 1969
- (141) WILLIAMS, T.W. and GRANGER, G.A.:
Lymphocyte in vitro cytotoxicity: Mechanism of human
lymphotoxin-induced target cell destruction.
Cell. Immunol. 6: 171-185, 1973
- (142) WOLSTENCROFT, R.A. and DUMONDE, P.C.:
In vitro studies of cell-mediated immunity. I. In-
duction of lymphocyte transformation by a soluble
mitogenic factor derived from interaction of sensi-
tized guinea-pig lymphoid cells with specific antigen.
Immunology 18: 599-610, 1970
- (143) YAMAMOTO, R.S., HISERODT, J.C., LEWIS, J.E., CARMACK, C.E.,
GRANGER, G.A.:
The human LT-system: II. Immunological relationship
of LT molecules released by mitogen activation lympho-
cytes in vitro.
Cell. Immunol. 38: 401-416, 1978
- (144) YAMAMOTO, R.S., HISERODT, J.C., GRANGER, G.A.:
The human LT-System: V. A comparison of the relative
lytic effectiveness of various MW human LT classes on
Cr-labeled allogeneic target cells in vitro: Enhanced
lysis by LT complexes associated with Ig-like re-
ceptor(s).
Cell. Immunol. 45: 261-275, 1979
- (145) YOUNG, C.W. and HODAS, S.:
Hydroxyurea: Inhibitory effect on DNA metabolism.
Science 146: 1172-1174, 1964

L E B E N S L A U F

Am 12. August 1953 wurde ich als Tochter von Johann Georg Dymarczyk und seiner Ehefrau Maria, geb. Bauer, in Wien geboren. 1954 zogen wir nach München. Hier besuchte ich von 1960 bis 1964 die Volksschule und anschließend das neusprachliche Gymnasium Max Josef-Stift. 1973 schloß ich die Schulausbildung mit dem Abitur ab.

Im Wintersemester 1973 immatrikulierte ich mich an der Ludwig Maximilians-Universität München und begann im Sommersemester 1974 das Studium der Humanmedizin. Im Sommer 1979 verbrachte ich ein Gastsemester an der Universität Bern, Schweiz. Im Praktischen Jahr war ich an der Universitätskinderklinik in Bern (Pädiatrie und Kinderchirurgie), an der Universitätsklinik Großhadern (Chirurgie) und am Städtischen Krankenhaus Schwabing (Innere Medizin). Die Ärztliche Prüfung legte ich am 29.4.1980 in München ab.

Im Immunologischen Labor der Kinderklinik der Universität München begann ich 1977 unter Leitung von Priv.Doiz.Dr.R.Eife die vorliegende Dissertation.

